Beziehungen zwischen Gaswechsel und ^{14}C-Einbau monochromatisch bestrahlter Algenzellen

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Ries
aus Westerstede (Oldb.)

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0100

Beziehungen zwischen Gaswechsel und ^{14}C-Einbau monochromatisch bestrahlter Algenzellen

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Eberhard Ries

aus Westerstede (Oldb.)

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1970

Dekan: Professor Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Metzner
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Schwemmle

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Metzner, danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, für die großzügige Unterstützung bei ihrer Durchführung und für viele wertvolle Hinweise.

Zu besonderem Dank bin ich auch Herrn Professor Dr. Erismann verpflichtet, der mir im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Bern eine von ihm entwickelte Anlage für Gaswechselmessungen zur Verfügung stellte, sowie Herrn Reto Strasser, Bern, für wertvolle Hilfe bei mehreren Messungen.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Material und Methodik 6

a) Algenkultur 6
b) Chlorophyllfreie Mutanten 9
c) Vorbehandlung der Algen zur ^{14}C-Fixierung 10
d) Beleuchtung 10
e) $^{14}CO_2$-Photosynthese und Extraktion der Algen 13
f) CO_2-Gaswechselmessungen 19
g) Dünnschicht-Chromatographie und -Elektrophorese 22
h) Autoradiographie und Radioaktivitätsbestimmung 24

III. Ergebnisse

a) ^{14}C-Einbaumuster in Abhängigkeit von der Lichtfarbe 27
b) Wirkungen von Metaboliten und Hemmstoffen 31
c) Beziehungen zwischen CO_2-Gaswechsel und ^{14}C-Einbau 31
d) Farblichtwirkungen auf die ^{14}C-Fixierung chlorophyllfreier Chlorella-Mutanten 52

IV. Diskussion

a) Der Lichtsteuerung unterworfene Stoffwechselwege 57
b) Mögliche Steuerungsmechanismen 73

V. Zusammenfassung 77

VI. Literatur 80

I. Einleitung

Die Kette photochemischer Reaktionen, in deren Verlauf das Kohlendioxid des Mediums in der Pflanzenzelle reduziert und in organische Verbindungen wie Kohlenhydrate und Proteine eingebaut wird, bezeichnen wir allgemein als "Dunkelprozeß" der Photosynthese. Tatsächlich vermag nun auch diese Reaktionsfolge in völliger Dunkelheit abzulaufen, wenn nur ihre energetischen Voraussetzungen erfüllt sind, d.h. wenn ausreichend ATP und reduzierte Pyridinnucleotide ("assimilatory power") zugegen sind. Prinzipiell ist es dabei gleichgültig, ob diese assimilatory power photosynthetisch im Licht oder chemosynthetisch im Dunkeln gewonnen, oder ob sie gar in Form eines NADPH-ATP-Gemisches isolierten Chloroplasten zugesetzt wird (58, 104).

Dennoch verläuft der Dunkelprozeß der Photosynthese nicht lichtunabhängig. Es konnte vielmehr durch eine Reihe von Arbeiten verschiedener Autoren gezeigt werden, daß die Richtung der Syntheseprozesse in der Pflanzenzelle sowohl durch die Intensität als auch durch die Farbe des Lichtes, dem die Pflanze ausgesetzt ist, beeinflußt wird.

Als erste beobachtete die russische Autorin N. P. VOSKRESENSKAYA (109, 110) derartige Lichtwirkungen. Sie stellte bereits 1952/53 fest, daß in Blättern verschiedener Pflanzen (Bohnen, Sonnenblumen, Zuckerrüben, Tabakarten) durch blaues Licht (450-580 nm) - verglichen mit der Wirkung roten Lichtes (580-700 nm) gleicher Quantenstromdichte - die Synthese organischer Stickstoffverbindungen, insbesondere Proteine, gefördert, die von Kohlenhydraten dagegen gehemmt wird.

Ähnliche Beobachtungen wurden im Laufe der kommenden Jahre von mehreren Autoren gemacht. Soweit deren Arbeiten den unterschiedlichen C-Einbau in Einzelverbindungen oder einzelne Stoffgruppen unter der Wirkung verschiedenfarbigen Lichtes untersuchen, lassen sie sich ihrer Fragestellung und vor allem ihrer Methodik nach in zwei Gruppen einteilen:

1. Zur Ermittlung des Wellenlängeneinflusses auf die Synthese der Endprodukte langfristiger Photosynthese werden die Pflanzen in rotem und blauem Licht herangezogen. Anschliessend wird rein chemisch, d.h. ohne vorhergehende radioaktive Markierung, ihr relativer Anteil an Assimilationsprodukten bestimmt.

2. Demgegenüber werden zur Ermittlung der Farblichteffekte auf frühe lösliche Intermediärprodukte der Photosynthese $^{14}CO_2$-Fixierungen während gleichzeitiger relativ kurzfristiger Farblichtbestrahlung der Pflanzen durchgeführt. Darauf erfolgt nach Abtötung und Extraktion der Gewebe und nach chromatographischer Auftrennung der Extrakte die Radioaktivitätsbestimmung der Einzelverbindungen.

Von den Arbeiten der ersten Gruppe wurden VOSKRESENSKAYAs Untersuchungen an höheren Pflanzen bereits erwähnt. In den Jahren 1960, 1962 und 1965 bestätigte KOWALLIK diese Ergebnisse auch für Chlorella (51, 52, 78). Er bestimmte das Verhältnis Kohlenhydrat/Protein in Abhängigkeit von der Farbe des Lichtes, in dem die Algen heranwuchsen. Sowohl bei Synchron- als auch bei Dauerlichtkulturen war dieses Verhältnis im Rotlicht gegenüber dem in Blaulicht zugunsten relativ höheren Kohlenhydratgehaltes verschoben. Schon geringe Energiebeträge von Blaulicht (um 200 erg/cm^{2}sec) führten bei sonst im Dunkeln gehaltenen Glucosekulturen zu einer deutlichen Erhöhung des relativen Proteingehaltes; der höchstmögliche Proteinspiegel wurde bei 4000 - 5000 erg/cm^{2}sec erreicht und in noch stärkerem Blaulicht beibehalten. Das Wirkungsspektrum der Proteinbildung zeigte nur ein breites Maximum bei 450-490 nm. Inzwischen erzielten auch andere Autoren (44, 72) gleichartige Ergebnisse.

Hinsichtlich der Endprodukte langfristiger Photosynthese wird man also als eindeutiges und gesichertes Ergebnis dieser Arbeiten die Steigerung des Proteingehaltes relativ zum Kohlenhydratgehalt der Zelle unter der Wirkung blauen Lichtes bezeichnen dürfen. Weniger einheitlich jedoch sind die Resultate verschiedener Autoren hinsichtlich der bei der Photo-

synthese auftretenden löslichen Zwischenprodukte wie Aminosäuren und organischen Säuren.

VOSKRESENSKAYA sowie VOSKRESENSKAYA und GRISHINA fanden 1956 (111, 112) in ^{14}C-Experimenten an höheren Pflanzen, daß Blaulicht die Markierung von Aspartat und Alanin (teilweise auf Kosten der Markierung von Malat), Rotlicht dagegen den C-Einbau in freie Kohlenhydrate erhöht.

CAYLE und EMERSON (20) stellten 1957 bei Chlorella pyrenoidosa fest, daß alle untersuchten Aminosäuren, namentlich auch Glycin und Serin, im Blaulicht wesentlich stärker markiert werden als im Rotlicht.

HAUSCHILD, NELSON und KROTKOV (34 - 37) hielten 1962 Suspensionen von Chlorella vulgaris aus Synchronkulturen für einige Stunden dunkel, belichteten sie dann 5 min mit rotem (650 ± 50 nm) bzw. blauem Licht (480 ± 150 nm) vor und bestrahlten sie nach Zusatz von ^{14}C-Bicarbonatlösung für weitere 30 min mit dem jeweils gleichen Licht. Nach papierchromatographischer Auftrennung der Algen-Extrakte erwies sich der ^{14}C-Gehalt von Aspartat, Glutamat, Malat und Fumarat der blau belichteten Zellen größer als der der rot belichteten. Demgegenüber wurde Glycin im roten Licht stärker markiert.

N. E. TOLBERT (102) sowie HESS und TOLBERT (42) ließen 1963 und 1967 Chlorella und Chlamydomonas im roten und blauen Licht heranwachsen und führten $^{14}CO_2$-Fixierungen ebenfalls im Rot- und Blaulicht durch. Nach Wachstum der Algen im Rotlicht wurden Malat, Aspartat, Glutamat und Alanin beträchtlich stärker markiert. Im Blaulicht dagegen erwiesen sich Glycin und Serin als wenig, Glycolat aber als bedeutend stärker markiert.

OGASAWARA und MIYACHI (71) bestätigten 1969 im wesentlichen die Ergebnisse von HAUSCHILD et al. (34 - 37). Sie fanden u.a., daß Chlorella ellipsoidea im Blaulicht (453 nm) mehr Radiokohlenstoff aus $^{14}CO_2$ in Aspartat, Glutamat und Malat einbaut, während im Rotlicht (679 nm) Phosphatester und freie Zucker stärker markiert werden.

Nach übereinstimmender Meinung aller Autoren werden freie Kohlenhydrate, soweit sie überhaupt erwähnt werden, im Rotlicht stärker markiert als im Blaulicht. Hinsichtlich des ^{14}C-Einbaues in alle anderen Verbindungen lassen sich beträchtliche Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Autoren feststellen:

Glycin wird nach CAYLE und EMERSON sowie nach TOLBERT im Blaulicht, nach HAUSCHILD et al. dagegen im Rotlicht stärker markiert.
Aspartat und Glutamat zeigen nach HESS und TOLBERT im Rotlicht stärkeren ^{14}C-Einbau, nach allen anderen Autoren jedoch im Blaulicht.
Malat wird nach VOSKRESENSKAYA sowie nach HESS und TOLBERT im Rotlicht verstärkt synthetisiert, nach HAUSCHILD et al. dagegen im Blaulicht.
Alanin schließlich wird nach VOSKRESENSKAYA sowie nach CAYLE und EMERSON im Blaulicht stärker markiert, nach TOLBERT jedoch im Rotlicht.

Es erscheint somit lohnend, die unterschiedliche C-Fixierung unter der Wirkung farbigen Lichtes erneut durch Markierungsexperimente zu untersuchen. Dabei soll dann, im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Arbeiten über lösliche Intermediärprodukte, in denen immer nur die Wirkungen zweier verschiedener Lichtfarben ("blau" und "rot") miteinander verglichen wurden, jeweils ein einfaches Aktionsspektrum für den ^{14}C-Einbau der wichtigsten Verbindungen für etwa 10 Wellenlängen, über den sichtbaren Teil des Spektrums verteilt, ermittelt werden.

Die mehr phänomenologische Registrierung von ^{14}C-Verteilungsmustern kann jedoch nur Ausgang, nicht Endziel unserer Untersuchung sein. Unter pflanzenphysiologischem und biochemischem Aspekt sind diese Muster Ausdruck von Stoffwechselwegen, die es zu ergründen gilt.
Es soll deshalb versucht werden, Anhaltspunkte für die vom Licht beeinflußten Reaktionsfolgen zu erlangen.

Derartige Anhaltspunkte sind nicht nur aus den ^{14}C-Verteilungsmustern, sondern vor allem auch aus dem Gaswechsel der Organismen unter Farblichteinfluß zu erwarten, der ja Ausdruck für die beiden zentralen Komplexe des Stoffwechselgeschehens Photosynthese und Atmung ist. Bei einem Teil der Versuche soll deshalb während der ^{14}C-Fixierungen gleichzeitig der CO_2-Gaswechsel gemessen werden. Es gilt dann, eventuelle Korrelationen zwischen diesem Gaswechsel und den ermittelten ^{14}C-Verteilungsmustern aufzufinden, die Hinweise auf die gesuchten Stoffwechselwege geben könnten.

Mit der Kenntnis der Stoffwechselwege ist aber die letztlich entscheidende Frage immer noch unbeantwortet, durch welche Mechanismen das Licht die Regulation des Stoffwechselflusses bewirkt.

Es stellt sich also eine dreifache Aufgabe:

1. Zunächst soll die Abhängigkeit des ^{14}C-Einbaues und gleichzeitig die des CO_2-Gaswechsels von der Lichtwellenlänge untersucht werden. Als Objekt soll dabei Chlorella pyrenoidosa Verwendung finden.

2. Es soll dann versucht werden, aus den ^{14}C-Verteilungsmustern und eventuellen Korrelationen zwischen ihnen und dem CO_2-Gaswechsel Schlüsse auf Reaktionsfolgen zu ziehen, die dem Lichteinfluß unterliegen.

3. Schließlich sind Möglichkeiten der lichtbedingten Steuerung des Stoffwechselflusses zu diskutieren, die Anhaltspunkte für spätere Untersuchungen geben könnten.

II. Material und Methodik

a) Algenkultur

Als Versuchsobjekt diente die einzellige Grünalge Chlorella pyrenoidosa Chick (Stamm 211-8b der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen). Die Algen wurden aus Schrägagarröhrchen in Kulturröhren von 42 cm Höhe und 3,6 cm lichter Weite mit einer Nährlösung folgender Zusammensetzung (91) überimpft:

KNO_3	809	mg/l	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2,2	mg/l
$NaNO_3$	681	mg/l	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	414	mg/l
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	23,6	mg/l	$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	178	mg/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,5	mg/l	H_3BO_3	2,5	mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,2	mg/l	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,074	mg/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,9	mg/l	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,025	mg/l

Zur Begasung wurde ein Gemisch aus 97 Vol.-% Luft und 3 Vol.-% CO_2 von unten in die Kulturröhren eingeleitet. Diese standen in einem Wasserbad, dessen Temperatur durch einen Thermostaten auf 30 ± 0,25°C einreguliert wurde.

Zur Beleuchtung fanden drei Leuchtstoffröhren vom Typ Philips TL 40 W/32 de Luxe und zwei vom Typ Philips TL 40 W/55 Verwendung. Die Anordnung von Lampen und Kulturröhren ergibt sich aus Abb.1. Die im Wasserbad an der den Leuchtstoffröhren zugewandten Seite der Kulturgefäße gemessene Beleuchtungsstärke betrug rund 9000 Lux (Messung mit einem Standard-Luxmeter der Firma Dr. B. Lange, Berlin).

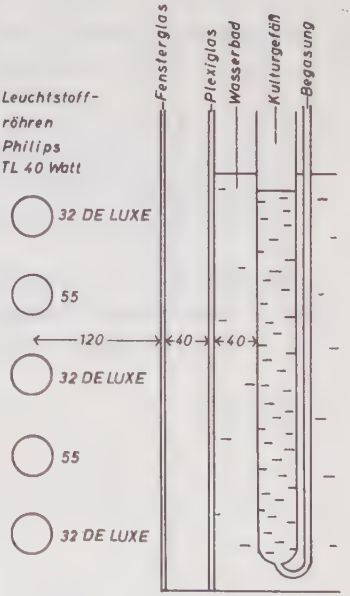


Abb.1 Anordnung von Kulturgefäß und Leuchtstoffröhren

Angestrebt wurde eine homokontinuierliche Dauerlichtkultur, wie sie von SENGER und WOLF angegeben wird (92). Deshalb fand die von den Autoren beschriebene automatische Verdünnungsanlage Verwendung, jedoch mit folgenden Abwandlungen (Abb. 2):
Die frische Nährlösung wurde nicht durch ein Magnetventil zugeführt, sondern von einer durch die Photozelle über Verstärker und Relais gesteuerten Schwachstrompumpe aus dem Vorratskolben durch das Begasungsrohr in die Kulturröhre gepumpt. Zur Konstanthaltung der Suspensionshöhe im Kulturgefäß wurde dagegen keine Pumpe verwendet. Die Röhre war mit einem Gummistopfen verschlossen, so daß der Begasungsstrom nur durch das in diesen Stopfen eingepaßte Ableitungsrohr entweichen konnte. Deshalb wurde durch den Druck des Belüftungsgases immer solange Algensuspension durch das Ableitungsrohr in ein Vorratsgefäß gepreßt, wie der Flüssigkeitsspiegel im Kulturgefäß die untere Öffnung des Ableitungsrohres überstieg.

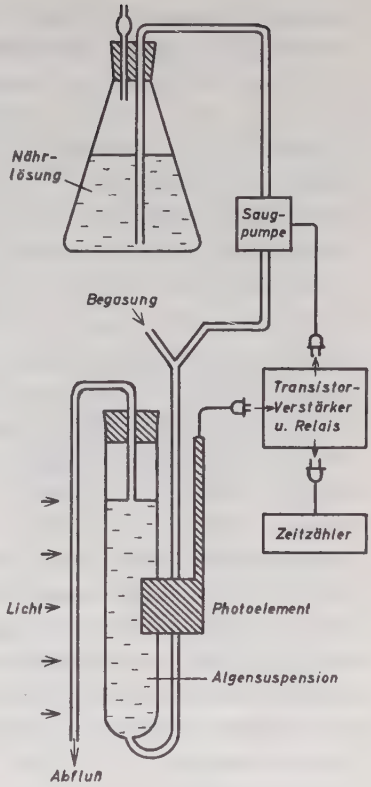


Abb. 2. Schematische Darstellung der automatischen Verdünnungsanlage

Der Schwellenwert, bei dem der Photostrom das Relais zur Einschaltung der Nährlösungspumpe betätigte, wurde mit dem Potentiometer am Transistor-Verstärker so reguliert, daß bei hinreichender Kulturdauer die mit Hilfe der Zählkammer "Thoma neu" ermittelte relative Zellzahl 1000-2000 betrug (entsprechend einer Zelldichte von $1{,}5\text{-}3 \cdot 10^7$ Zellen/ml) und bei diesem Wert konstant blieb. Eine Probe der Suspension zeigte dann unter dem Mikroskop Zellen aller Altersstufen

und gab ein morphologisch konstantes Bild. Wie die erzielten unterschiedlichen ^{14}C-Fixierungsmuster jedoch zeigten, handelte es sich dabei offenbar nicht immer um p h y s i o l o g i s c h völlig konstante Zellsuspensionen. Ob bei Kulturen mit Zelldichten, wie sie von SENGER (92) angegeben werden (2,4 bis $3{,}6 \cdot 10^6$ Zellen/ml), auch zu sehr verschiedenen Zeiten entnommene Algenproben ein immer gleiches Fixierungsmuster ergeben würden, muß offen bleiben. Für automatisch verdünnte Kulturen mit so hoher Zelldichte wie im vorliegenden Falle (um $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml) war jedoch der Nitratgehalt der Nährlösung offenbar nicht ausreichend. Bei Verdünnung von Hand lassen sich zwar ohne Schwierigkeiten sogar noch höhere Zelldichten erzielen, ohne daß N-Mangel akut werden muß, da die Kulturen bei Erreichen ihrer endgültigen Suspensionsdichte entweder geerntet oder mit größerer Menge frischer Nährlösung und damit neuen N-Vorräten auf ein mehrfaches Volumen verdünnt werden. Bei der automatisch verdünnten Kultur erfolgt dagegen bei Erreichen der Grenz-Kulturdichte nur ein sehr geringer Nährlösungszulauf, der für eine ausreichende N-Versorgung nicht genügt, zumal die hohe Zelldichte nicht einmal vorübergehend nennenswert verringert wird. Sinkt nun auch noch infolge des Stickstoffmangels die Vermehrungsrate der Algen, so verstärken sich Ursache und Wirkung gegenseitig: Nimmt infolge verringerter Zellvermehrung die optische Dichte der Suspension nicht mehr oder nur noch geringfügig zu, so erfolgt auch keine beträchtliche Verdünnung mehr. Mit der Drosselung des Nährlösungszulaufs aber werden die Organismen weiter geschädigt, so daß schließlich keine Zellteilungen mehr erfolgen.

In einer solchen Mangelkultur werden praktisch alle Nitrat-Ionen von den Algen aus der Nährlösung entfernt, ohne daß eine entsprechende Kationen-Aufnahme erfolgt. Wird jetzt die Begasung abgesetzt oder durch eine Luftbegasung ersetzt, so kommt es nach entsprechendem CO_2-Entzug aus dem Bicarbonat bzw. schließlich aus dem Carbonat der Nährlösung zu einem schnellen pH-Anstieg auf Werte von 10-11 oder noch darüber. Solange jedoch das Begasungsgemisch einige Prozent CO_2 ent-

hält, erfolgt eine ständige Neutralisierung durch die Kohlensäure, so daß der Mangel nicht durch einen pH-Anstieg zum Ausdruck kommt.

Werden solch extreme Wirkungen bei Einstellung der Verdünnungsautomatik auf einen niederen Wert optischer Dichte nicht erreicht, so kann doch ein relativer Stickstoffmangel entstehen, der je nach eingestellter Kulturdichte, nach Kulturalter usw. verschieden große Werte erreicht, wodurch dann recht verschiedene ^{14}C-Fixierungsmuster resultieren.

Bei einem Teil der Versuche konnte die automatische Verdünnungsanlage aus technischen Gründen keine Anwendung finden. In diesen Fällen wurde unter Verwendung der gleichen Nährlösung, der gleichen Kulturgefäße usw. die Verdünnung täglich von Hand vorgenommen.

Sollen nun Wirkungen äußerer Einflüsse auf ^{14}C-Fixierungsmuster untersucht werden, so kann aus den genannten und ähnlichen Gründen als Kontrolle immer nur ein Fixierungsmuster der gleichen Algensuspension aus derselben Versuchsreihe dienen; an anderen Tagen ermittelte ^{14}C-Verteilungen sind dazu ungeeignet, unabhängig davon, ob die Kulturen automatisch oder von Hand verdünnt wurden.

b) Chlorophyllfreie Mutanten

Für einige Versuche wurden chlorophyllfreie Chlorella-Formen benötigt. Verwendung fanden die Mutanten Chlorella pyrenoidosa M 31 nach BENDIX und ALLEN (10) und Chlorella vulgaris Nr. 211-11 H/ 20 der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen.

Die Anzucht erfolgte unter den für die "normale" Chlorella pyrenoidosa beschriebenen Bedingungen; der sonst gleichen Nährlösung wurden lediglich 0,5 % Glucose zugesetzt. Eine Verdünnung der steril angezogenen Suspensionen erfolgte hier in der Regel nicht. Die Algen fanden Verwendung, sobald sie die gewünschte Zelldichte (um $1{,}5 \cdot 10^7$ Zellen/ml) erreicht hatten.

Um eine Infektion der beiden als chlorophyllfrei beschriebenen Mutanten mit grünen Algen ("Wildformen") sicher ausschliessen zu können, wurden beide vor ihrer Verwendung mit Dimethylformamid sowie mit Aceton extrahiert und die Extrakte spektralphotometrisch und dünnschichtchromatographisch untersucht. Für beide Organismen war dabei nicht die geringste Spur Chlorophyll nachweisbar.

c) Vorbehandlung der Algen zur ^{14}C-Fixierung

Eine mögliche Nachwirkung des "weißen" Lichtes der Leuchtstoffröhren, in dem die Algen herangewachsen waren, sollte durch Dunkelhaltung der Zellsuspensionen für einige Stunden vor der $^{14}CO_2$-Photosynthese ausgeschlossen bzw. gemindert werden. Zu diesem Zweck wurden die benötigten Suspensionsmengen aus den Kulturgefäßen in verschlossene Flaschen pipettiert, die im Dunkeln in Abständen von einigen Minuten geschüttelt wurden. Eine Begasung der Suspensionen erfolgte dabei nicht.

d) Beleuchtung

Für die ersten Versuche wurde auf streng monochromatisches Licht verzichtet, da zunächst nur ermittelt werden sollte, inwieweit überhaupt Unterschiede im ^{14}C-Markierungsmuster unter der Wirkung verschiedenfarbigen Lichtes auftraten.
Zu fordern waren Filter, deren Haupttransmissionsbereiche den Blau- und Rot-Absorptionsmaxima von Chlorella möglichst nahe kommen. Außerdem sollte das Rotfilter im Bereich kürzerer Wellenlängen möglichst absolut undurchlässig sein, da nach HAUSCHILD et al. (34-37) bereits ein Zusatz von nur 4 % blauem Licht zum roten im wesentlichen die Wirkungen reinen blauen Lichtes auf die Algen besitzt. Diese Forderungen erfüllten die Farbglasfilter der Firma Schott & Gen., Mainz, RG 630 für rotes und BG 28 sowie BG 27 für blaues Licht bei 3 mm Glasstärke am besten.

Für die Aufnahme der Wirkungsspektren kamen nur Interferenzfilter in Betracht, da mehrere Messungen bei verschiedenen Wellenlängen über den sichtbaren Spektralbereich verteilt

und jeweils bei geringer Bandbreite durchgeführt werden mußten. Zur praktisch völligen Ausschaltung der Untergrundstrahlung erschien die Benutzung von Doppelfiltern zweckmäßig. Bei Doppellinienfiltern war jedoch infolge der sehr geringen Bandbreite und des niedrigen Transmissionsgrades der transmittierte Energieanteil für eine ausreichende Photosynthese zu gering. Die Wahl fiel deshalb auf Doppelbandfilter der Firma Schott & Gen., Mainz. Diese Filter transmittieren im Maximum durchschnittlich 30 %. Die gegenüber den Linienfiltern größere Halbwertsbreite von durchschnittlich 16 nm erschien hier nicht als Nachteil, da ohnehin sehr differenzierte Wirkungsspektren nicht zu erwarten waren. Die λ-Werte in den Transmissionsmaxima der verwendeten Filter sind 404, 423, 433, 458, 480, 515, 551, 615, 676, 694 und 734 nm.
Für die Wahl der Lichtquelle war bestimmend, daß eine Fläche von einigen Zentimetern Durchmesser möglichst homogen und mit möglichst großer Energie auszuleuchten war. Für die Benutzung der Farbglasfilter RG 630, BG 28 und BG 37 erfüllte bei geringem technischen Aufwand der Projektionsapparat Leitz Prado 500 mit 500 W-Projektionslampe und Kleinbildkondensor (15 cm) diese Forderungen am besten. Bei diesem Gerät wird im Bereich des Bildfensters eine Kreisfläche von 50 mm Durchmesser homogen ausgeleuchtet.
Zur Minderung des infraroten Lichtes, das energetisch den größten Teil des gesamten Projektorlichtes darstellt, mußte das Wärmeschutzfilter des Prado im Gerät belassen werden, wodurch die Transmission der erwähnten Schott-Filter stark modifiziert wurde. Zur Ermittlung der Transmissionskurven (Abb. 3, S. 12) wurde deshalb jeweils die Kombination aus einem Schott-Filter und dem Wärmeschutzfilter des Prado im Spektralphotometer PM Q II der Firma Carl Zeiß durchgemessen. Das durch diese Farbglasfilterkombinationen transmittierte Licht wird im folgenden mit "Rot 630", "Blau 28" und "Blau 37" bezeichnet, während das Interferenzfilterlicht nur durch Angabe der Wellenlänge in nm im Transmissionsmaximum charakterisiert wird. Zur Einfügung der Filter in den Strahlengang des Projektionsapparates wurde vor dem Kondensor ein Filtereinschub angebracht.

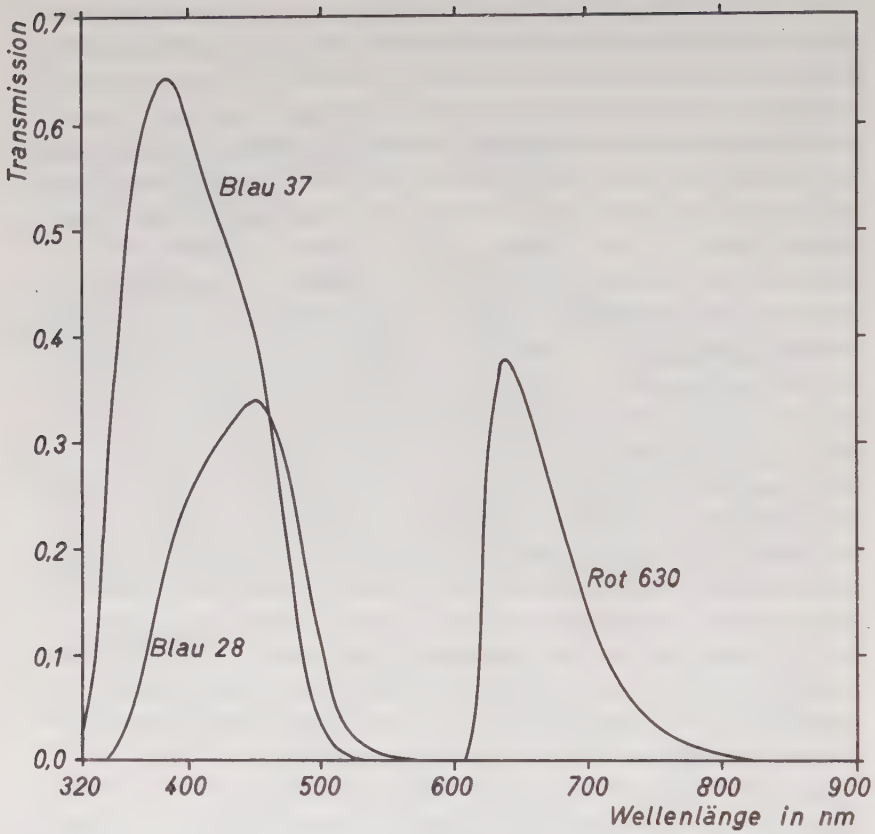


Abb. 3 Transmission der Farbglas-Filterkombinationen

Bei der Anwendung der hitzeempfindlichen Interferenzfilter erschien die Benutzung des Leitz Prado als Lichtquelle wegen seiner relativ großen Wärmeentwicklung als zu riskant. Für diese Versuche erwies sich ein von SCHOSER (88) entwickelter Monochromator (Hersteller: Zeutschel, Hirschau b. Tübingen) als zweckmäßig. Bei diesem Gerät handelt es sich um einen Projektor, dessen optisches System im wesentlichen aus einer Niedervolt-Ellipsoidreflektorlampe besteht, bei der Leuchtkörper, Spiegelkondensor und Hilfsspiegel in einem einzigen

Bauelement vereinigt sind. Der mit diesem Gerät ausgeleuchtete Durchmesser der zunächst benutzten ^{14}C-Fixierungsküvette betrug 6 cm. Für die späteren Versuche wurde das Gerät mit einer noch lichtstärkeren Jodquarzlampe 15 Volt 150 Watt (Philips 6423) bestückt, die ^{14}C-Fixierungsküvette verkleinert und durch Einsatz einer Linse mit kürzerer Brennweite am vorderen Ende des Objektivtubus des Monochromators der Durchmesser des ausgeleuchteten Kreises auf knapp 4 cm verkleinert. Durch diese Maßnahme wurde eine wesentliche Steigerung der Quantenstromdichte erzielt.
Die Einstellung der jeweils gewünschten Beleuchtungsstärke erfolgte durch Regulierung der Spannung an dem zur Speisung der Projektorlampe verwendeten Regeltransformator.
Zur Messung der Beleuchtungsintensität wurde eine Thermosäule (Typ CA1-671342 der Firma Kipp & Zonen) mit einem Spiegelgalvanometer (Typ Multiflex MG O der Firma Dr.B.Lange, Berlin) verwendet. Die Messungen erfolgten in Luft im gleichen Abstand von der Lichtquelle, in dem sich auch die dem Projektor zugekehrte Innenseite der ^{14}C-Fixierungsküvette während der Versuche befand. Die durch die Küvettenscheiben und vor allem durch die 12,5 mm dicke Algensuspension bedingten Absorptionsverluste wurden dabei nicht berücksichtigt, da die genaue absolute Größe der Beleuchtungsintensität im Hinblick auf die Problemstellung bedeutungslos war. Bei der Beurteilung der im einzelnen angegebenen Beleuchtungsintensitäten ist aber zu berücksichtigen, daß der durchschnittliche Lichtgenuß der einzelnen Zelle bei der gegebenen grossen Zelldichte gegenüber diesen Werten um schätzungsweise 40-60 % niedriger lag.

e) $^{14}CO_2$-Photosynthese und Extraktion der Algen

Um nach der ^{14}C-Fixierung eine Vermischung der Nährlösung mit dem Extraktionsmittel und damit eine Anreicherung von Nährsalzen im eingeengten Algenextrakt zu vermeiden, wurde bei allen $^{14}CO_2$-Fixierungen, bei denen nicht gleichzeitig Gaswechselmessungen erfolgten, von der "klassischen" Methode CALVINs (6) abgewichen. Statt dessen wurde die Photosynthese

nach METZNER (65) mit im Gasraum auf nassem Filtrierpapier verteilten Chlorella-Zellen durchgeführt. Dazu wurden je 10 ml Algensuspension nach der Dunkelbehandlung in einem Sterilfiltrationsgerät der Göttinger Membranfilter-Gesellschaft unter Verwendung eines Rundfilters abgesaugt. Das nasse Filter mit den Algen wurde in ein $^{14}CO_2$-Fixierungsgefäß gelegt.

Für die anfänglichen Versuche wurde das Fixierungsgefäß nach METZNER (65) verwendet (Abb. 4). In die dafür vorgesehene Kapsel (Abb. 4, Pfeil) dieses Gefäßes waren zuvor 0,25 ml einer $NaH^{14}CO_3$-Lösung (160 µc/ml) einpipettiert und die beiden nach außen führenden Glasrohre des Deckels mit Gummihütchen verschlossen worden. Das Fixierungsgefäß wurde sodann mit aufgesetztem Deckel in die Halterung am

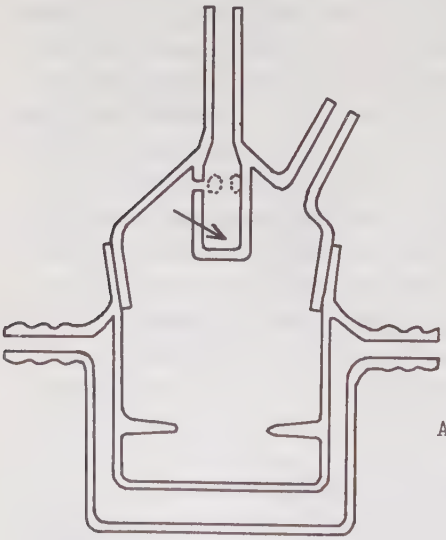


Abb. 4 ^{14}C-Fixierungsgefäß nach METZNER

Projektor eingesetzt und die Algen 3 min mit blauem oder rotem Licht vorbelichtet. Darauf wurden zur Freisetzung von $^{14}CO_2$ 0,2 ml verdünnte Schwefelsäure (10 Vol.-%) durch das Gummihütchen in die ^{14}C-Bicarbonatlösung gespritzt und die

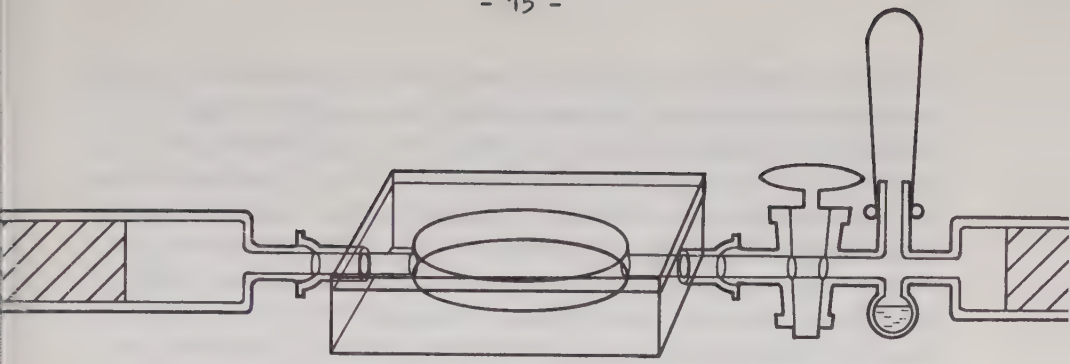


Abb. 5 ^{14}C-Fixierungsvorrichtung

Algen für weitere 3 min belichtet. Gleichzeitig wurde durch laufendes "Pumpen" mit Hilfe des anderen Gummihütchens am schräg angesetzten Glasrohr für hinreichende Verteilung des radioaktiven Kohlendioxids im Gefäßraum gesorgt.

Die Konzentration der verwendeten ^{14}C-Bicarbonatlösung betrug 6 µM/ml; das Fixierungsgefäß hatte ein Innenvolumen von 60 ml. Es gelangten somit 33,6 µl $\hat{=}$ 0,056 Vol.-% CO_2 in den Gasraum des Fixierungsgefäßes. Rechnet man hierzu 0,03 Vol.-% CO_2 der Luft, so ergibt sich eine CO_2-Gesamtkonzentration von 0,086 %. Die Radioaktivität im Gasraum des Gefäßes betrug 0,67 µc/ml.

Bau und Anordnung des Fixierungsgefäßes erwiesen sich jedoch als für diese Versuche noch nicht ganz befriedigend. Die nassen Rundfilter mit den Algen lassen sich auf die dafür vorgesehenen Glasdornen im Innenraum der Gefäße nicht absolut eben auflegen. Bei der schrägen Lichteinstrahlung bewirken aber geringe Unterschiede in der Durchwölbung der Filter große Unterschiede der Beleuchtungsstärke je Flächeneinheit und damit der Fixierungsrate. Wesentlich günstiger ist senkrechter Lichteinfall auf die algenbedeckte Papieroberfläche. Dieser wäre zwar mit Hilfe eines Spiegels erzielbar gewesen, dabei wären aber die Algen bei dem gegebenen Bau der Fixierungsgefäße nur in derart großer Entfernung vom Kondensor anzuordnen gewesen, daß die Lichtintensität für eine befriedigende Photosynthese-Rate nicht mehr ausgereicht hätte.

Deshalb wurde für die weiteren Versuche das in Abb. 5 (S. 15) gezeigte Fixierungsgefäß angefertigt: Ein quadratischer Plexiglasblock wurde 5 mm tief mit einem Durchmesser von 40 mm zylindrisch ausgebohrt. Durch seitliche Bohrungen wurden 2 Glasröhrchen eingeführt und verkittet, die außen in je einen Kugelschliff endeten. Über den Kugelschliff der einen Seite wurde das Gefäß direkt mit einer Kolbenspritze verbunden. An der anderen Seite wurde eine gleiche Spritze angebracht, jedoch unter Zwischenschaltung eines Glashahnes und eines vertikalen, nach unten kugelig verschlossenen, nach oben offenen Glasröhrchens, das zur Aufnahme der $NaH^{14}CO_3$-Lösung diente; über dessen Öffnung wurde ein Pipettenhütchen gezogen.

Zur Durchführung der ^{14}C-Fixierungen wurde das nasse Rundfilter mit den Algen in die zylindrische Bohrung gelegt und diese durch Auflegen einer Glasplatte nach oben verschlossen. Ein zuvor aufgetupfter Wassertropfen, der sich kapillar zwischen Plexiglasblock und Glasdeckel verteilte, machte das Gefäß gasdicht. Ob der Wasserfilm wirklich zusammenhängend war und den vollständigen Verschluß bewirkte, konnte leicht optisch kontrolliert werden. Die abdeckende Glasplatte wurde durch zwei Metallklammern gehalten.

Auch hier wurden zur Freisetzung des $^{14}CO_2$ 0,2 ml verd. H_2SO_4 (20 Vol.-%) bei verschlossenem Glashahn durch das Pipettenhütchen in die radioaktive Bicarbonatlösung injiziert. Zum Fixierungsbeginn wurde der Glashahn geöffnet und durch Hin-und-herpumpen mit den Kolben der beiden Spritzen eine gründliche Durchmischung des Gasraumes bewirkt.

Das Innenvolumen des gesamten Systems betrug 25 ml. Bei gleicher Menge und Konzentration der ^{14}C-Bicarbonatlösung wie oben beschrieben errechnet sich damit ein CO_2-Gehalt von 0,16 % und eine Radioaktivität von 1,6 µc/ml im Gasraum.

Die Beleuchtung der Algen erfolgte hier vertikal von oben über einen vor dem Zeutschel-Monochromator angebrachten Spiegel.

Nach der Photosynthese wurden die Algen durch Einwerfen des Rundfilters in siedendes 60%iges Äthanol (50 ml) getötet und 30 min extrahiert. Nachdem der Extrakt durch Zentrifugieren von den Zellresten befreit worden war, wurde er mit dem gleichen Volumen Diäthyläther z.A. (Merck) und einem Viertel seines Volumens an dest. Wasser ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbad-Temperatur von 35° C zur Trockene gebracht und in 0,4 ml dest. Wasser wieder aufgenommen. Die so erhaltenen Lösungen wurden bis zur Weiterverarbeitung im Tiefkühlschrank bei -20° C aufbewahrt.

Alle ^{14}C-Fixierungen, bei denen gleichzeitig CO_2-Gaswechselmessungen erfolgten, wurden mit Zellen durchgeführt, die in derselben Nährlösung suspendiert waren, in der sie auch heran-

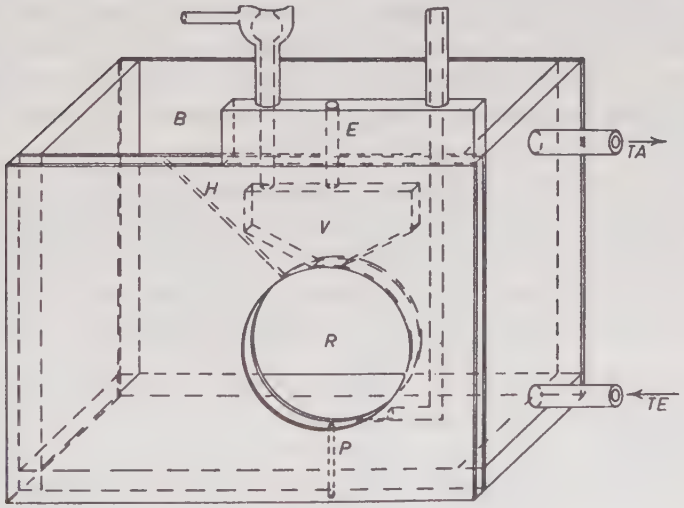


Abb. 6 Algenküvette nach EGGENBERG

B Wasserbad mit Einlauf (TE) und Auslauf (TA)
E Einführkanal für pH-Elektrode
H Hilfskanal zum Einfüllen von Flüssigkeiten
P Kanal für die Probenentnahme
R Reaktionsraum mit Algensuspension
V Vorraum zum Auffangen von Spritzern

gezogen worden waren (s. METZNER und LORENZEN, 66), deren pH-Wert jedoch vor dem Dunkelstellen der Algen durch Zusatz von Phosphorsäure auf 5,0 eingestellt wurde. Der radioaktive Kohlenstoff wurde als $^{14}CO_2$ mit dem zur Durchlüftung der Suspensionen benutzten Gasgemisch (Luft mit 0,04-0,05 Vol.-% CO_2) zugeführt.

Anfänglich (Versuch 6) fand zur Fixierung eine von P. EGGENBERG, Bern, konstruierte Küvette aus Plexiglas (Abb. 6) Verwendung. Der zylindrische Raum zur Aufnahme der Zellsuspensionen hatte eine Tiefe von 12 mm und einen Durchmesser von 6 cm. Einführung und Entnahme der Suspension erfolgten mit Hilfe einer Kolbenspritze durch je eine dafür angebrachte Bohrung. Durch je eine weitere Bohrung von oben und von unten erfolgten Zufuhr und Abfuhr des Begasungsstromes. Eine fünfte Bohrung nahm eine Glaselektrode auf, mit deren Hilfe eine ständige pH-Kontrolle erfolgte. Schließlich besaß die Küvette auf der Seite, von der die Beleuchtung erfolgte, eine separate Kammer, die während der Versuche zur Aufrechterhaltung der Temperaturkonstanz ständig von thermostatisiertem Wasser von 28° C durchströmt wurde.

Für die weiteren Experimente wurde diese EGGENBERGsche Küvette in nur wenig modifizierter Form nachgebaut, wobei insbesondere der Durchmesser der Algenkammer auf 37 mm verringert wurde, da durch Verkleinerung des Lichtbündels eine grössere Beleuchtungsintensität erzielt werden sollte.

In die zunächst benutzte größere Küvette wurden für jede Fixierung 25 ml Algensuspension gegeben, die nach Beendigung der $^{14}CO_2$-Photosynthese in 55 ml Methanol eingespritzt wurden, das am Rückflußkühler zum Sieden gebracht worden war. Die kleine Küvette wurde jeweils mit 12 ml Suspension beschickt, die zum Abtöten und zur Extraktion in 26 ml siedendes Methanol eingespritzt wurden. Die weitere Aufarbeitung der Extrakte erfolgte wie oben (S. 17) beschrieben.

Als Beleuchtungsgerät diente bei allen zusammen mit Gaswechselmessungen durchgeführten $^{14}CO_2$-Fixierungen der Zeutschel-Monochromator.

f) CO_2-Gaswechselmessungen

Für alle Gaswechselmessungen, die im geschlossenen System erfolgten, fand eine von ERISMANN im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Bern entwickelte steady-state-Anlage Verwendung (25). Abbildung 7 gibt ein einfaches Schema der wichtigsten der hier in Funktion getretenen Elemente dieser Anlage. Das Diagramm Abb. 8 veranschaulicht den Versuchsablauf:

Zum Zeitpunkt t = O werden die Algen in die Küvette gegeben und das Farblicht eingeschaltet. Dabei sind die beiden Dreiwegehähne an der Küvette so eingestellt, daß ein nicht-radio-

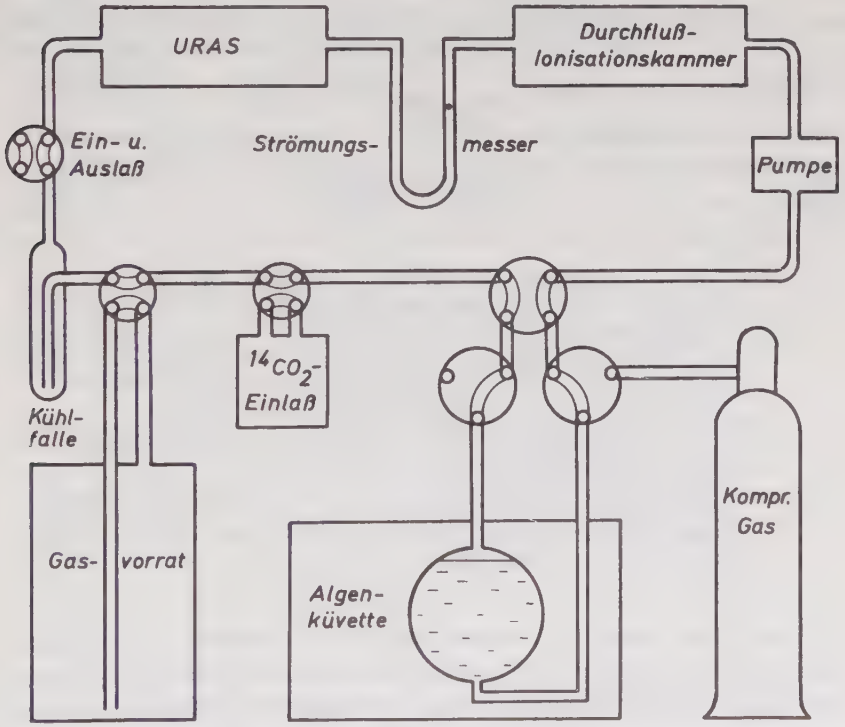


Abb. 7 Versuchsanordnung für CO_2-Gaswechselmessungen während gleichzeitiger ^{14}C-Fixierungen

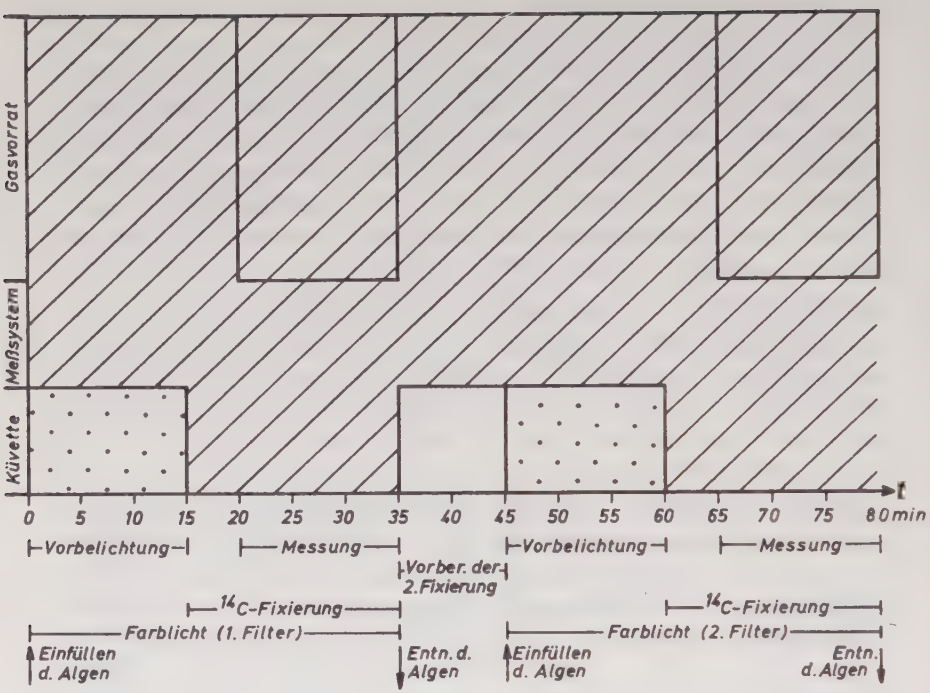


Abb. 8 Versuchsprogramm der ^{14}C-Fixierungen während gleichzeitiger CO_2-Gaswechselmessungen

Die Schraffur bezeichnet den radioaktiven Inhalt der verschiedenen auf der Ordinate (nicht quantitativ) übereinander abgetragenen Räume der Anlage. Punktierung kennzeichnet die Algen, solange sie vom ^{14}C-freien Gasgemisch aus der Stahlflasche durchlüftet werden. Miteinander verbundene Räume sind auch im Diagramm zusammenhängend gezeichnet. Die zeitweilige Abtrennung einzelner Räume ist durch entsprechende Linien zum Ausdruck gebracht.

aktives, sonst aber dem Gasgemisch im Kreislauf gleiches Gasgemisch (Luft mit wenig zusätzlichem Kohlendioxid) aus einer Stahlflasche die Algensuspension durchströmt. Durch einen Vierwegehahn wird der Gaskreislauf des Meßsystems kurzgeschlossen. Nach 15 min Vorbelichtung wird die Gasflasche geschlossen; die beiden Dreiwegehähne und der Vierwegehahn werden so ein-

gestellt, daß die Küvette in den Kreislauf einbezogen wird, so daß das $^{14}CO_2$-haltige Gasgemisch des Meßsystems die Algensuspension durchströmt.

Nach 5 min Fixierungsdauer wird durch einen besonderen Hahn ein Gas-Vorratsgefäß aus dem Kreislauf abgetrennt, um das Gasvolumen soweit zu verkleinern, daß die CO_2-Zu- bzw. -Abnahme hinreichend genau durch den URAS gemessen werden kann. Ein Mehrpunkteschreiber zur Registrierung von pH-Wert der Suspension, Radioaktivität und CO_2-Konzentration im Gasraum wird eingeschaltet. Nach weiteren 15 min ^{14}C-Fixierungszeit wird der Kreislauf wieder kurzgeschlossen und darauf der Vorrat zur Konstanthaltung der CO_2-Konzentration wieder in den Kreislauf einbezogen. Nach Entnahme der Algen, Wechseln des Farbfilters, Spülen der Küvette und erneutem Einfüllen von Algensuspension beginnt die nächste Fixierung.

Alle Versuche erfolgten bei CO_2-Konzentrationen von 0,04 -0,05 Vol.-% im Gasraum. Um die bei dieser Konzentration für ausreichende ^{14}C-Fixierungen erforderliche hohe spezifische Aktivität im Gasraum zu erzielen, wurde vor Versuchsbeginn alles in der Apparatur befindliche inaktive CO_2 in der Kühlfalle mit Hilfe flüssiger Luft ausgefroren. Aus $NaH^{14}CO_3$ (mit spez. Aktivitäten zwischen 50 und 57 mC/mM) und verd. H_2SO_4 wurde dann $^{14}CO_2$ entwickelt und ohne Verdünnung mit inaktivem CO_2 in das System eingeschleust.

Das Innenvolumen des gesamten Systems einschl. des Vorrates betrug rund 6 l. Zur Erzielung einer CO_2-Konzentration von 0,04 % wären also 2,4 ml CO_2-Gas erforderlich gewesen, die einem Einsatz von $NaH^{14}CO_3$ mit einer Aktivität von 4,8 mC bei einer spez. Aktivität von 50 mC/mM entsprochen hätte. Tatsächlich wurde jedoch schon durch einen $NaH^{14}CO_3$-Einsatz von etwa 3,6 mC mit einer spez. Aktivität von 0,57 mC/mM eine Konzentration von reichlich 0,04 Vol.-% CO_2 im Gasraum erreicht bei entsprechend geringerer Aktivitätsanzeige durch die Ionisationszählkammer. Möglicherweise war von Schlauchverbindungen und dergl. absorbiertes inaktives CO_2 nicht mit ausgefroren worden und im System verblieben, das dann

nach der $^{14}CO_2$-Zugabe mit dem aktiven Gas austauschte. Da für unsere Fragestellung nur die in Abhängigkeit von der Lichtfarbe fixierten relativen Aktivitäten, kaum aber die genauen absoluten Werte interessierten, wurde dieser Frage nicht weiter nachgegangen.

g) Dünnschicht-Chromatographie und -Elektrophorese

Zur Auftrennung der Extrakte kamen eine eigene dünnschichtchromatographische Methode (83) und ein weiteres Verfahren aus Dünnschicht-Elektrophorese (1. Dimension) und Dünnschicht-Chromatographie (2. Dimension) nach SCHÜRMANN (90) zur Anwendung.

Zur zweidimensionalen Dünnschicht-Chromatographie wurden 20 g Kieselgel HR (Merck) und 20 g Cellulose MN 300 (Macherey und Nagel) mit 160 ml dest. Wasser auf 20 x 20 cm großen Glasplatten 0,5 mm stark ausgestrichen. Nach dem Trocknen der Platten an der Luft wurden je nach Stärke der Radioaktivität 1 - 40 µl der Algenextrakte mit "automatischen" Mikropipetten der Firma H. E. Pedersen, Kopenhagen, in der linken unteren Ecke 2,5 cm von den Kanten der Platten entfernt punktförmig aufgetragen.
Nachdem das erste Fließmittel (n-Butanol - Aceton - Diäthylamin-Wasser 10:10:2:5) 9 cm über den Startfleck gestiegen war, wurden die Platten im Luftstrom getrocknet und erneut in das gleiche Fließmittel eingestellt, bis dieses eine Steighöhe von 15 cm erreicht hatte.
Im 2. Fließmittel (sek. Butanol - Ameisensäure - Wasser 6:1:2) erfolgte nur einmalige Entwicklung in zweiter Richtung bis 15 cm über den Startfleck.

Zum Trennverfahren nach SCHÜRMANN fanden 0,5 mm stark ausgestrichene Schichten aus 15 g Cellulose MN 300, 90 ml dest. Wasser und 1 ml einer 0,1 molaren Lösung von Titriplex III (Merck) auf Glasplatten 20 x 20 cm Verwendung. Nach dem Trocknen an der Luft wurden die Algenextrakte wie oben beschrieben aufgetragen. Anschließend wurden die Platten mit Pyridin-Essigsäure-Puffer pH 4,0 (10 ml Pyridin, 35 ml Eisessig,

mit Wasser aufgefüllt auf 1000 ml) besprüht und darauf 50 min unter Kühlung (0° C) der Elektrophorese bei 800 Volt unterworfen. Nach dem Trocknen wurden sie zur Dünnschicht-Chromatographie in das Fließmittel (Butanol-(2) - Ameisensäure - Wasser 6:1:2) eingestellt. Nachdem dieses bis 8 cm über den Startfleck gestiegen war, wurden die Platten wieder getrocknet und erneut im gleichen Fließmittel bis zu einer Steighöhe von 16 cm über dem Startfleck entwickelt. - Abb. 9 zeigt das erzielte Substanzmuster am Beispiel eines Autoradiogramms.

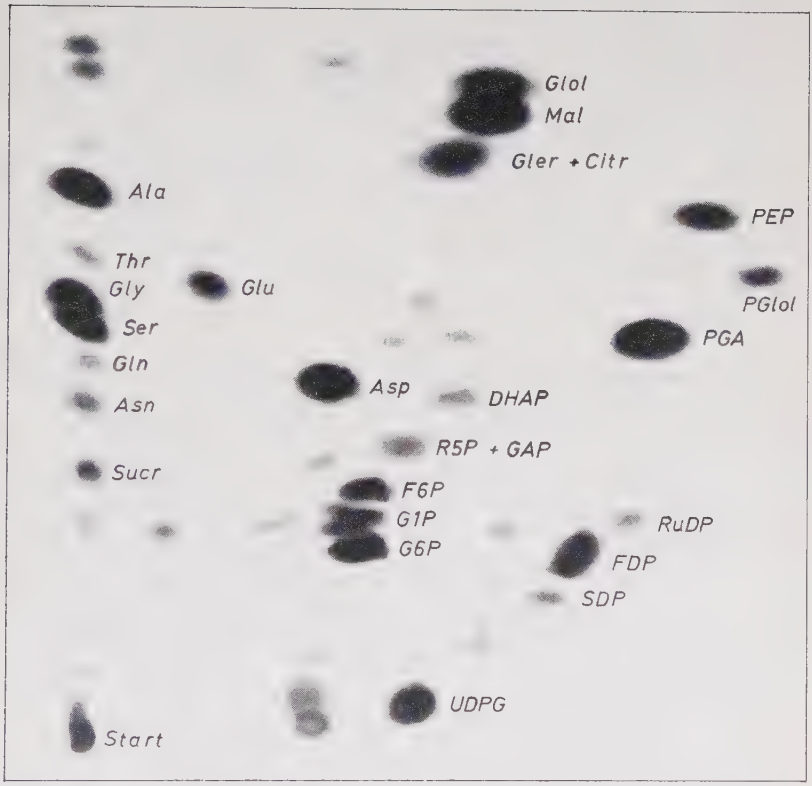


Abb. 9 Autoradiogramm eines Chlorella-Extraktes nach zweidimensionaler Trennung durch Dünnschicht-Elektrophorese (horizontal) und -Chromatographie (vertikal). 6 min $^{14}CO_2$-Fixierung in weißem Licht von $8 \cdot 10^4$ erg/cm^{2}sec. - Abkürzungen s. S. 79.

h) Autoradiographie und Radioaktivitätsbestimmung

Zum autoradiographischen Nachweis der Substanzflecken auf den Dünnschichtplatten wurden nach Anbringung radioaktiver Markierungspunkte seitlich der Chromatogramme Röntgenfilme (Gevaert Osray DW) aufgelegt und mit Glasplatten abgedeckt. Platten und Filme wurden dann mit Aluminiumfolie umschlagen und bis zur Entwicklung der Filme für 2 - 50 Tage im Dunkeln exponiert.

Zur Messung der Radioaktivität fand anfangs der Methan-Durchflußzähler FH 407 der Firma Frieseke & Hoepfner, Erlangen, später der Flüssigkeits-Szintillationszähler DPM 100 von Beckman Verwendung.
Zur Bestimmung der Gesamtaktivitäten der Algenextrakte wurden von jedem Extrakt vor dem Ausschütteln mit Äther dreimal je 0,2 ml abpipettiert und jeweils 0,05 ml Ameisensäure hinzugefügt.
Zur Messung mit dem Durchflußzähler wurden diese Proben auf Aluminium-Planchetten zur Trockene gebracht und je dreimal 1 min gemessen.

Bei Anwendung des Szintellationszählers wurden die Proben in 20 ml-Plastikfläschchen mit 10 ml Szintillatorflüssigkeit nach F. SNYDER (95) vermischt (10,5 g PPO; 0,45 g POPOP; 150 g Naphthalin; mit Dioxan auffüllen auf 1500 ml; mit Wasser auffüllen auf 1800 ml). Die Meßdauer betrug hier 10 - 30 min. In der Ätherphase, die beim Ausschütteln der Extrakte resultierte, wurde auf gleiche Weise eine Radioaktivität von durchschnittlich 6 % von der des Ausgangsextraktes gefunden. Wurden die Extrakte jedoch ein zweites Mal mit Äther ausgeschüttelt, so war in der neuen Ätherphase keine Radioaktivität mehr nachweisbar.
Zur Ausmessung der Radioaktivität der einzelnen Substanzflecke mit dem Methan-Durchflußzähler wurden die Platten in 15 µm starke Hostaphan-Folie der Fa. Kalle & Co, Wiesbaden, eingeschlagen, um eine radioaktive Contamination des Zählrohres sicher auszuschließen. Die Zählausbeute verringerte sich dadurch allerdings um 53,5 %. Die Lage der Substanz-

flecken wurde nach der Radioautographie auf der Folie markiert. Während der Messung wurde der umgebende Bereich mit einer Schablone aus dünnem Weißblech abgedeckt. Die Meßdauer betrug in der Regel 10 min, bei schwach markierten Flecken, die von besonderem Interesse waren, jedoch bis zu 120 min.

Zur Messung mit dem Szintillationszähler wurden die Substanzflecken direkt auf der Dünnschicht markiert. Dazu wurden sie zunächst von den Radioautographien auf ein Blatt transparentes Papier übertragen. Dieses wurde dann auf die Dünnschichtplatten gelegt und die einzelnen Fleckumrandungen mit einem Kugelschreiber nachgezogen. Die nachgezogenen Linien wurden so als Vertiefungen in der Dünnschicht deutlich sichtbar. Darauf wurde die Schicht im Bereich der Flecken mit einem Spatel in 20 ml-Plastikfläschchen gekratzt und mit jeweils 10 ml des angegebenen Szintillators übergossen. Nach einer ein- bis zweistündigen Behandlung auf der Schüttelmaschine wurden die Lösungen je 20 - 50 min lang gemessen.

III. Ergebnisse

a) ^{14}C-Einbaumuster in Abhängigkeit von der Lichtfarbe[1)]

Tabelle 1 faßt die Versuche 1 bis 4 zusammen. Es handelt sich dabei um 3 min-Fixierungen im Gasraum (s. S. 13-16) ohne gleichzeitige Gaswechselmessungen. Die Auftrennung der Extrakte erfolgte dünnschichtchromatographisch.
Vier Autoradiogramme aus Versuch 2 wurden in früheren Arbeiten wiedergegeben (2, 83).
Bei Versuch 1 und 2 wurden von jedem Extrakt 2 oder mehr Chromatogramme angefertigt und die Ergebnisse gemittelt. Die angegebenen Werte der Versuche 3 und 4 stützen sich dagegen nur auf jeweils 1 Chromatogramm und sind insoweit statistisch weniger gesichert.

Tabelle 2 bringt die Ergebnisse einer 6 min-Fixierung (Versuch 5), die ebenfalls im Gasraum erfolgte. Hier wurden von jedem der beiden Extrakte 2 Dünnschicht-Chromatogramme und 3 Elektropherogramme ausgewertet.

Die wohl auffälligste Wirkung der Lichtfarbe ist die Steigerung des ^{14}C-Einbaues in Saccharose im Rotlicht. Demgegenüber werden Aspartat und Malat im Blau stärker markiert als im Rot.

Aus den unterschiedlichen ^{14}C-Gehalten von Glycolat sollen keine Schlüsse gezogen werden, da wegen der Flüchtigkeit dieser Verbindung nicht vorausgesetzt werden kann, daß die Konzentrationen auf den getrockneten Chromatographieplatten noch den Verhältnissen im frischen Extrakt entsprechen.

Bei Fumarat und Glutamat sind die gemessenen Aktivitäten nach 3 min Photosynthese noch zu gering, um bei der gegebenen Zahl von Proben statistisch gesicherte Ergebnisse daraus ableiten zu können. Nach 6 min Photosynthese (Versuch 5, Tabelle 2) kann jedoch der im Blau erhöhte Wert für Glutamat bereits als signifikant angesehen werden.

---

1) Verwendete Abkürzungen s. S. 79

Metabolit o. Inhibitor	Versuch 1		Versuch 2									
					2-P-Glycerat		3-P-Glycerat		Puromycin		Pyrithiamin	
Lichtfarbe	Rot 630	Blau 28	Rot 630	Blau 37	Rot 630	Blau 37	Rot 630	Blau 37	Rot 630	Blau 37	Rot 630	Bla 37
Gesamtakt. im Extrakt	37	39	230	185	221	191	206	309	177	191	190	13
Alanin	54	57	49	49	52	42	56	38	65	71	80	5
Glycin	23	25	18	18	25	15	18	15	32	26	26	1
Serin	41	43	52	51	65	51	60	43	64	67	69	5
Glutamat	5	8	10	11	11	8	8	8	7	8	10	1
Aspartat	71	102	82	110	86	104	95	124	53	86	93	12
Malat	74	114	153	164	195	211	194	218	88	140	148	18
Fumarat	4	4	8	6	8	8	10	8	9	10	9	1
Glycerat	19	14	15	14	11	11	10	8	50	11	14	1
Glycolat	28	19	64	39	45	44	52	40	51	76	61	4
P-Ester	589	556	459	472	423	452	434	457	438	430	406	42
Saccharose	61	25	42	20	31	15	39	12	87	30	55	1
Unbekannt	31	33	48	46	48	39	24	29	56	45	29	3
Aspartat/ Saccharose	1,2	4,1	2,0	5,5	2,8	6,9	2,4	10,3	0,6	2,9	1,7	7,

Tabelle 1 Gesamtaktivität der Algenextrakte und ^{14}C-Verteilung auf die einzelnen äthanol-wasser-löslichen Fixierungsprodukte von Chlorella pyrenoidosa nach 3 min Vorbelichtung und 3 min $^{14}CO_2$-Photosynthese im Gasraum in rotem ($5 \cdot 10^4$ erg/cm^{2}sec) und blauem Licht ($7{,}5 \cdot 10^4$ erg/cm^{2}sec).

Versuch 3		Versuch 4											
					Puromycin			3-P-Glycerat					
Rot 630	Blau 37	Rot 630	Blau 37	Blau 28	Rot 630	Blau 37	Blau 28	Rot 630	Blau 37	Blau 28	Rot 630	Blau 37	Blau 28
235	187	49	41	45	40	38	42	34	30	47	41	57	50
55	53	36	31	35	33	52	40	35	33	32	40	39	44
18	12	18	18	17	18	24	23	21	19	17	28	15	17
39	35	23	20	18	24	34	23	28	33	27	33	23	18
6	10	2	3	11	9	10	9	3	6	4	9	5	7
54	69	53	73	72	39	79	70	49	78	54	59	71	70
75	101	113	143	170	113	142	139	186	216	166	133	163	162
4	4	5	11	3	7	4	3	5	8	8	8	6	6
5	7	14	7	19	16	23	22	15	9	19	13	13	16
5	4	17	11	13	13	14	9	15	8	12	13	5	8
510	506	582	548	567	540	482	530	551	503	581	546	545	551
168	126	60	51	29	116	93	75	40	46	24	52	40	18
61	73	77	84	46	72	43	57	52	41	56	66	75	83
0,3	0,55	0,88	1,4	2,5	0,34	0,85	0,9	1,2	1,7	2,3	1,1	1,8	3,9

Gesamtaktivität in 1000 Imp./min, gemessen mit Methan-Durchflußzähler.
^{14}C-Anteile der Einzelsubstanzen in Promille der Gesamtstrahlung der jeweiligen Chromatogramme.

	Rot 630	Blau 28
Alanin	50	58
Threonin	3	4
Glycin	36	36
Serin	46	48
Asparagin	11	11
Glutamat	11	14
Aspartat	55	82
Malat	189	200
Fumarat	4	8
Succinat	5	5
Citrat	5	10
Glycerat	38	28
Phosphoglycerat	200	176
Phosphoenolpyruvat	15	15
Phosphoglycolat	9	9
Zuckermonophosphate	167	176
Fructosediphosphat	18	14
Uridindiphosphoglucose	59	60
Saccharose	39	7
Unbekannt	40	39
Total	1000	1000

Tabelle 2 (Versuch 5)
^{14}C-Verteilung in Promille der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme nach 5 min Vorbelichtung und 6 min $^{14}CO_2$-Photosynthese.

b) Wirkungen von Metaboliten und Hemmstoffen

Um Anhaltspunkte für bestimmte Stoffwechselwege zu erlangen, von denen vermutet wurde, daß sie der Lichtsteuerung unterliegen, wurden je einige Proben der Algen für die Dauer der Dunkelbehandlung mit 3-Phosphoglycerat ($5 \cdot 10^{-3}$ molar), 2-Phosphoglycerat ($5 \cdot 10^{-3}$ M), Puromycin ($2 \cdot 10^{-4}$ M) und Pyrithiamin (10^{-3} M) inkubiert.

Zusatz von 3-Phosphoglycerat bewirkt gegenüber den übrigen Proben eine signifikante Erhöhung der Markierung von Malat. Die Unterschiede in der Blau- und Rotlichtwirkung bleiben davon unberührt (Tabelle 1, Versuche 2 und 4). 2-Phosphoglycerat scheint gegenüber 3-Phosphoglycerat keine wesentlich andere Wirkung auszuüben (Versuch 2).

Puromycin erhöht die Saccharose-Markierung beträchtlich, scheint also ähnlich wie rotes Licht zu wirken (Tabelle 1, Versuch 2 und 4; Tabelle 7, Versuch 9). Die Puromycinwirkung auf die Markierung von Aspartat und Glutamat ist nicht ganz einheitlich. Aus dem Ergebnis von Versuch 9 (Tabelle 7) darf nicht ohne weiteres auf eine Erhöhung der Aspartat-Markierung durch Puromycin geschlossen werden, da hier die Fixierungsrate gegenüber den Kontrollen um über 50 % herabgesetzt war, wodurch an sich schon unter den hier gegebenen Schwachlichtbedingungen der relative ^{14}C-Einbau in Aspartat erhöht wird. In jedem Falle senkt Puromycin den Quotienten aus der Markierung von Aspartat und Saccharose erheblich.

Bei Pyrithiamin war eine eindeutige Wirkung nicht festzustellen. Möglicherweise dringt dieser Stoff nicht in die Zelle ein (Tabelle 1, Versuch 2).

c) Beziehungen zwischen CO_2-Gaswechsel und ^{14}C-Einbau

Die erste Versuchsreihe zur Klärung der Beziehungen zwischen dem Gaswechsel und der ^{14}C-Markierung von Einzelverbindungen in Abhängigkeit von der Wellenlänge wurde mit energiegleichem Licht von 1800 erg/cm^{2}sec durchgeführt.

Abbildung 10 zeigt den gemessenen Gaswechsel und die ^{14}C-Gesamtaktivität der Algenextrakte. Wie die Gaswechselkurve zu erkennen gibt, reichte die Beleuchtungsintensität zur Kompensation nicht aus. Völlig überraschend aber war zunächst das Fehlen eines Blaugipfels bei beiden Kurven; der Kurvenverlauf erwies sich jedoch unter den gegebenen Bedingungen als reproduzierbar.

Die Abbildungen 11 bis 18 zeigen für jede Wellenlänge und für die Dunkelfixierung je ein Autoradiogramm. Die Verteilung der Radioaktivität auf die Einzelverbindungen wird durch die Tabellen 3 und 4 wiedergegeben. Abbildung 19 und 20 veranschaulichen den ^{14}C-Einbau in einige wichtige Intermediärprodukte graphisch. Zur Auswertung kamen von jedem Extrakt 4 bis 5 Elektropherogramme.

Wie die Autoradiogramme, Tabellen und Kurven zeigen, ist unter den gegebenen Bedingungen im Blaubereich der Kohlenstoffeinbau in Aspartat, Glutamat und Malat relativ begünstigt. Zum Rotbereich des Spektrums hin nimmt die Synthese von Phosphatestern und Saccharose relativ und absolut sehr stark zu. Auch steigt mit zunehmender Wellenlänge die Markierung von Glycin absolut und relativ zu der von Serin.

Die weiteren Versuchsreihen sollten bei verschiedenen Beleuchtungsintensitäten - jedoch bei innerhalb der jeweiligen Versuche gleichen Quantenstromdichten - durchgeführt werden; vor allem aber sollten die $^{14}CO_2$-Fixierungen auch oberhalb des Kompensationspunktes erfolgen. Nachdem zu diesem Zweck die erreichbare maximale Beleuchtungsintensität durch Änderung der Beleuchtungsapparatur sowie der $^{14}CO_2$-Fixierungs-Küvette erhöht worden war (S. 13), wurde folgendes Versuchsprogramm aufgestellt:

1. Es sollte ein Wirkungsspektrum mit 9 Meßpunkten bei maximal erreichbarer Beleuchtungsenergie ermittelt werden. Wegen der relativ geringen Blau-Emission der Projektorlampe wurden die Filter 404 und 423 nm für diese Meßreihe (wie schon für Versuch 6) nicht mit eingesetzt, da sonst die

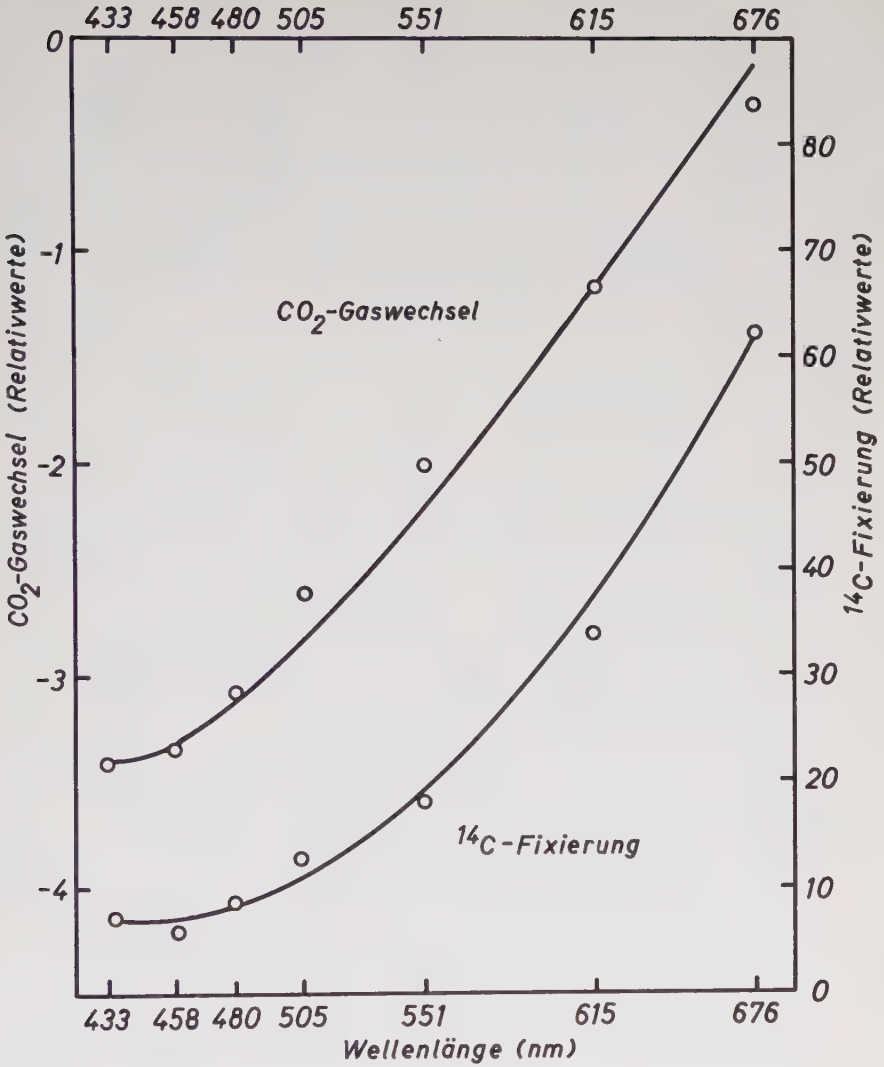
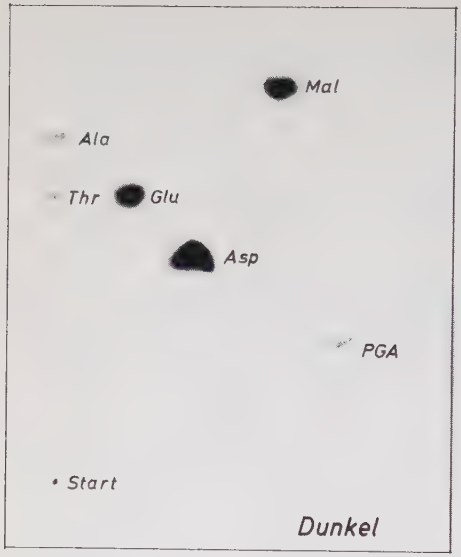
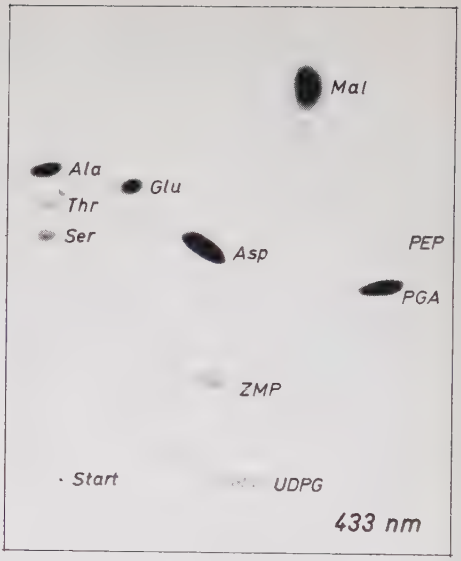
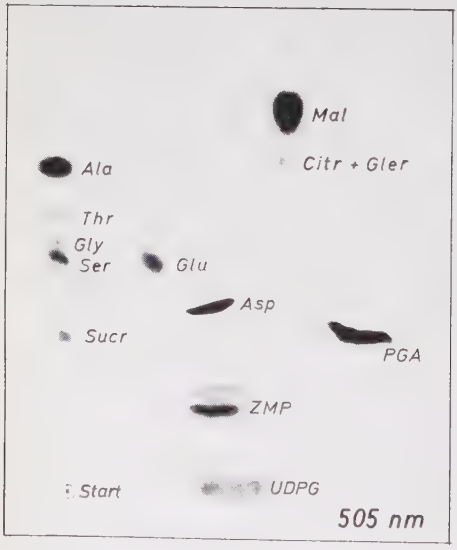


Abb. 10 (Versuch 6). CO_2-Abgabe der Algen, gemessen als CO_2-Zunahme im Medium,(obere Kurve)
und ^{14}C-Fixierung, gemessen als Radioaktivität der Algenextrakte, (untere Kurve) in Abhängigkeit von der Wellenlänge.
15 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Photosynthese im energiegleichen Licht von 1800 erg/cm^{2}sec. Begasung der Algensuspensionen mit Luft mit 0,04 % CO_2 b.28° C.







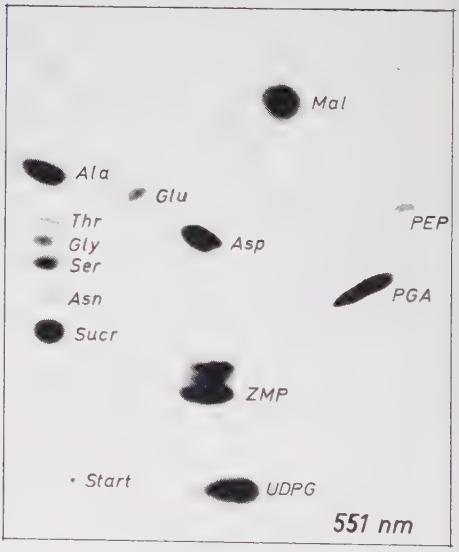
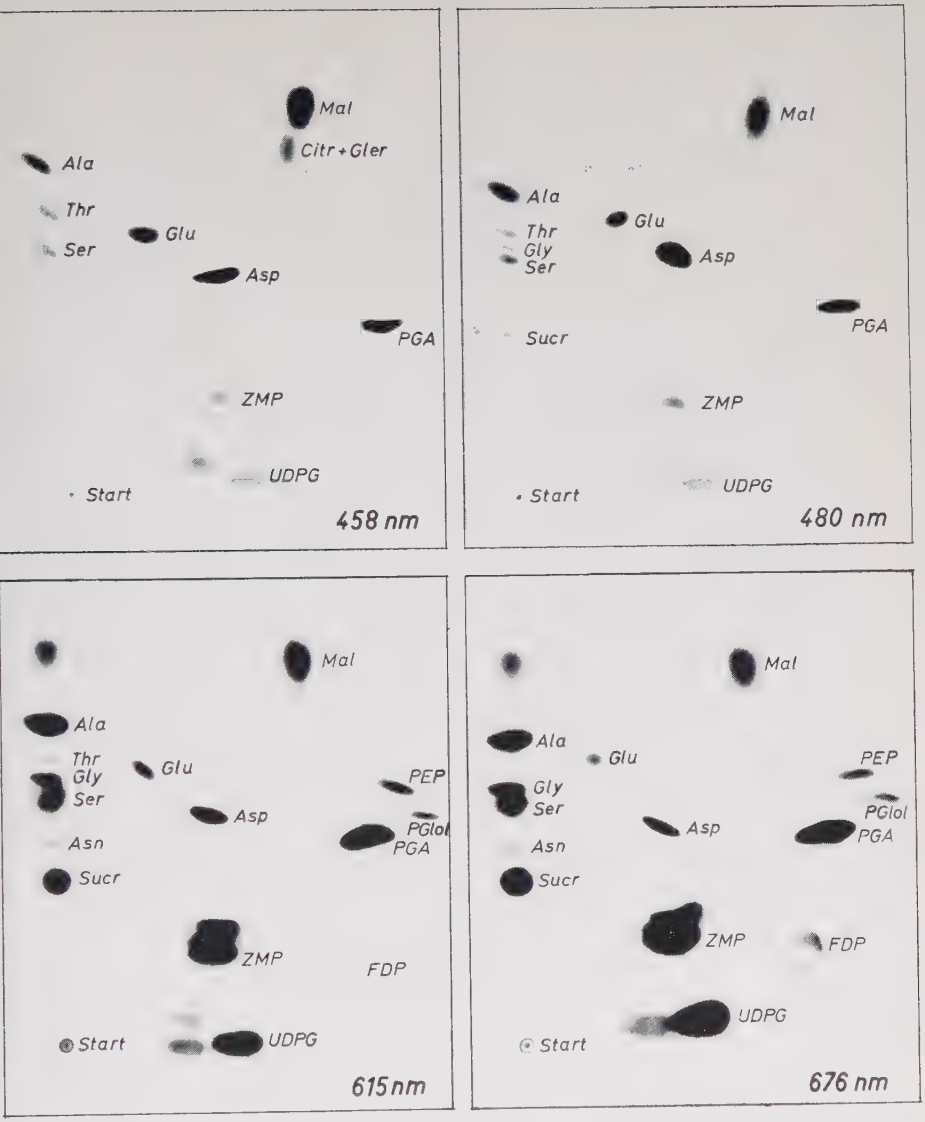


Abb. 11 - 18 (Versuch 6).

Autoradiogramme von Chlorella-Extrakten nach dünnschicht-elektrophoretischer und -chromatographischer Auftrennung.



15 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Photosynthese im energiegleichen monochromatischen Licht von 1800 erg/cm^{2}sec. Begasung der Algensuspensionen mit Luft mit 0,04 % CO_2 bei 28° C.

λ (nm)	433	458	480	505	551	615	676	Weiß energiegleich	Dunkel	Weiß Starklicht
Ala	58	34	67	57	81	79	73	13	16	44
Thr	8	8	9	8	4	3	2	6	9	6
Gly + Ser	24	17	22	20	35	44	63	18		61
Asn	3	3	4	2	3	2	3			6
Glu	41	50	46	25	11	5	4	80	171	6
Asp	382	425	420	372	139	64	36	477	556	39
Mal	145	170	142	165	86	34	27	121	178	114
Citr + Gler	34	46	24	15	3	3	2	48		5
PGA	102	87	73	154	226	279	246	28	19	64
PGlol				1	3	3	5			46
PEP	2	2	2	3	4	8	7			5
ZMP	67	42	62	74	164	206	222			190
FDP		3	9	6	11	10	18	194		29
UDPG	65	50	55	51	105	110	125			66
Sucr	5	3	7	10	92	112	131			153
Unbekannt	64	60	58	37	33	38	36	15	51	166
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tabelle 3 (Versuch 6). Relative ^{14}C-Verteilung auf einzelne Fixierungsprodukte in Promille der Gesamtaktivität der jeweiligen Elektropherogramme nach 15 min Vorbelichtung u.20 min $^{14}CO_2$Fixierung im energiegleichen monochromatischen Licht von 1800 erg/cm^{2}sec.

λ (nm)	433	458	480	505	551	615	676	Weiß energiegleich	Dunkel	Weiß Starklicht
Ala	50	31	66	78	143	269	455	4	4	669
Thr	7	7	9	11	7	10	12	2	2	91
Gly + Ser	21	15	22	27	61	149	393	5		927
Asn	3	3	3	3	5	7	19			91
Glu	35	45	46	34	19	17	25	23	44	91
Asp	327	382	416	510	245	218	224	139	142	593
Mal	125	153	142	226	151	116	168	35	45	1733
Citr + Gler	29	41	24	21	5	10	12	14		76
PGlol				1	5	10	31			699
PGA	88	78	72	210	398	949	1533	8	5	973
PEP	2	2	2	4	7	27	44			76
ZMP	58	38	61	101	290	700	1383			2888
FDP		3	9	9	19	34	112	56		441
UDPG	56	45	54	70	185	374	779			1003
Sucr	4	3	7	14	162	381	816			2326
Unbekannt	55	54	57	51	58	129	224	4	13	2523
Total	860	900	990	1370	1760	3400	6230	290	255	15200

Tabelle 4 (Versuch 6). Absolute ^{14}C-Verteilung auf einzelne Fixierungsprodukte in DPM/10 µl Algenextrakt nach 15 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Fixierung im energiegleichen monochromatischen Licht von 1800 erg/cm^{2}sec.

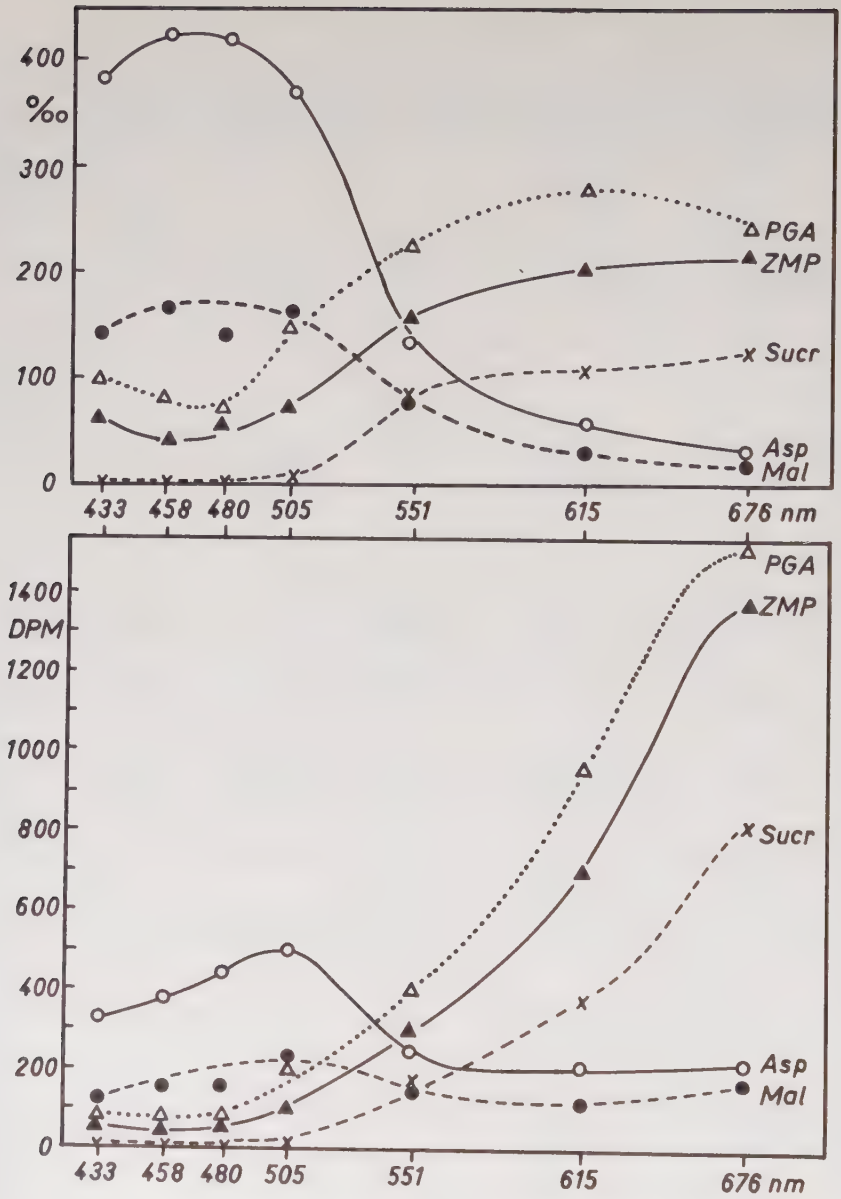


Abb. 19 (Versuch 6). Relative ^{14}C-Verteilung auf einzelne Fixierungsprodukte in Promille.

Abb. 20 (Versuch 6). Absoluter ^{14}C-Gehalt einzelner Fixierungsprodukte in DPM/10 µl Algenextrakt.

Versuchsbedingungen s. Abb. 10.

Quantenstromdichte für die gesamte Meßreihe hätte reduziert werden müssen.

2. Die Interferenzfilter 404 und 423 nm wurden zusammen mit den Filtern 458, 551 und 676 nm für eine Meßreihe bei gleicher Quantenstromdichte unterhalb des Kompensationspunktes vorgesehen.

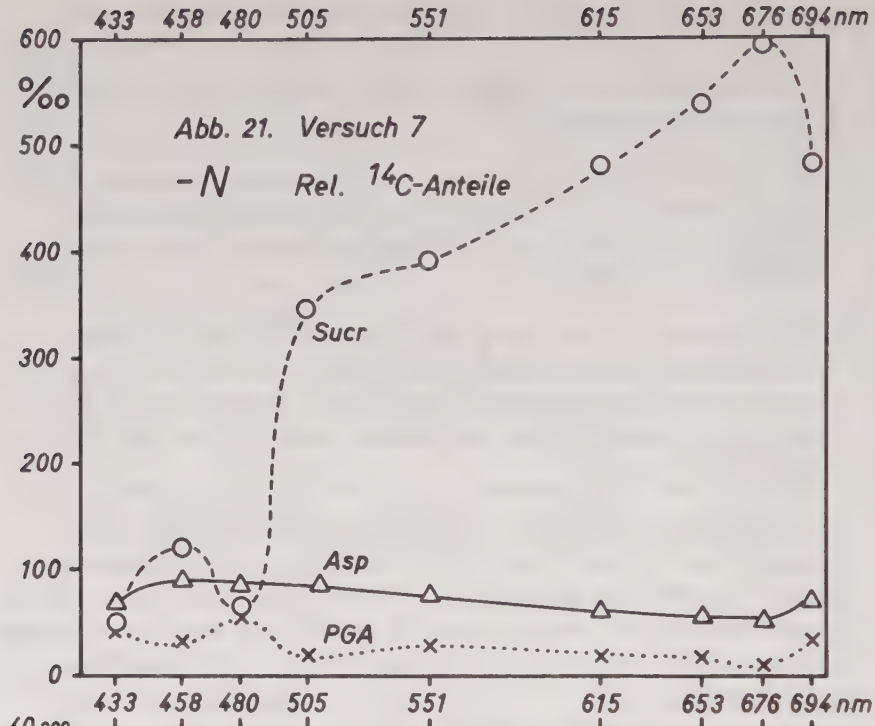
3. Schließlich sollten zwei Fixierungen bei 458 und 676 nm bei gleicher Fixierungsrate erfolgen, die als gleicher Gaswechsel - und zwar im Kompensationspunkt - durch Vorversuche (Variation der Beleuchtungsstärke) zu ermitteln war.

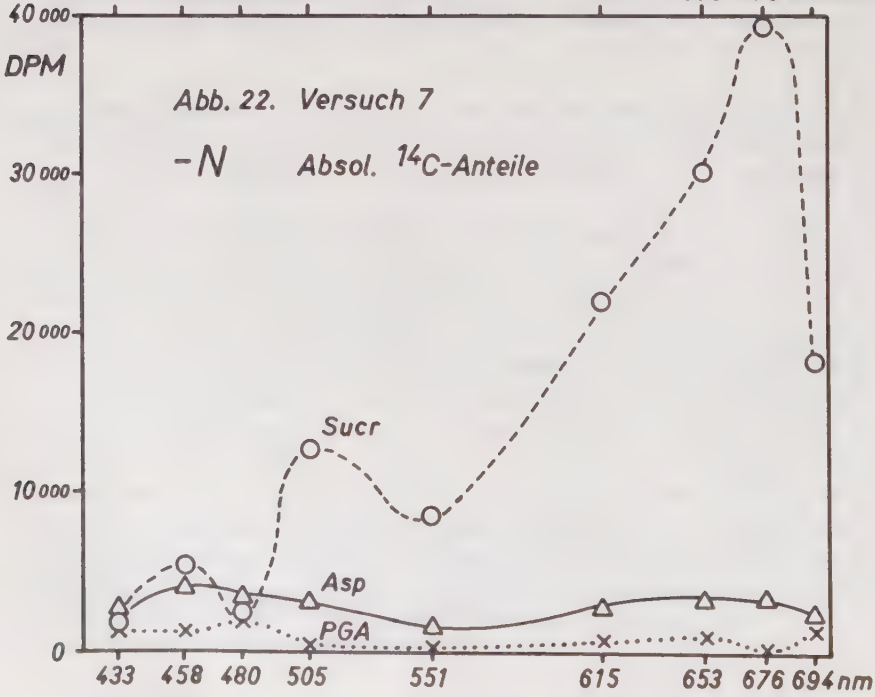
Vor Durchführung der ersten beiden dieser Versuchsreihen (Versuch 7 und 9) war der pH-Wert der Algensuspensionen auf über 10 angestiegen gewesen (s. S. 8). Deshalb wurden diese Versuchsreihen mit Zellen wiederholt, die vor den Experimenten täglich zweimal abzentrifugiert und in neue Nährlösung übertragen worden waren, so daß eine ausreichende Versorgung mit Stickstoff und anderen Nährstoffen sichergestellt war (Versuche 8 und 10).

Die Ergebnisse der bei maximal erreichbarer Beleuchtungsstärke durchgeführten Versuche 7 und 8 werden durch die Abbildungen 21 - 25 und die Tabellen 5 - 8 dargestellt.

In Versuch 7 (N-Mangelalgen) erfolgte bereits im Blaulicht eine nicht unbeträchtliche Saccharose-Markierung, Rotlicht (bzw. fehlendes Blaulicht) aber bewirkte hier zu Lasten aller übrigen Fixierungsprodukte einen ungewöhnlich steilen Anstieg des ^{14}C-Einbaues in diesen Zucker. Nach Photosynthese im Licht von 676 nm fanden sich 60 % des fixierten Radiokohlenstoffs in Saccharose wieder.

Bei reichlicher Mineralsalz-Versorgung der Algen dagegen erfolgt unter sonst gleichen Bedingungen (Versuch 8) nur eine äußerst geringe Saccharose-Markierung, die nicht mehr signifikant von der Lichtwellenlänge abhängig ist. Aspartat und


433 458 480 505 551 615 653 676 694 nm
600
‰
500
400
300
200
100
0
Abb. 21. Versuch 7
-N Rel. 14C-Anteile
Sucr
Asp
PGA


433 458 480 505 551 615 653 676 694 nm
40 000
DPM
30 000
20 000
10 000
0
Abb. 22. Versuch 7
-N Absol. 14C-Anteile
Sucr
Asp
PGA

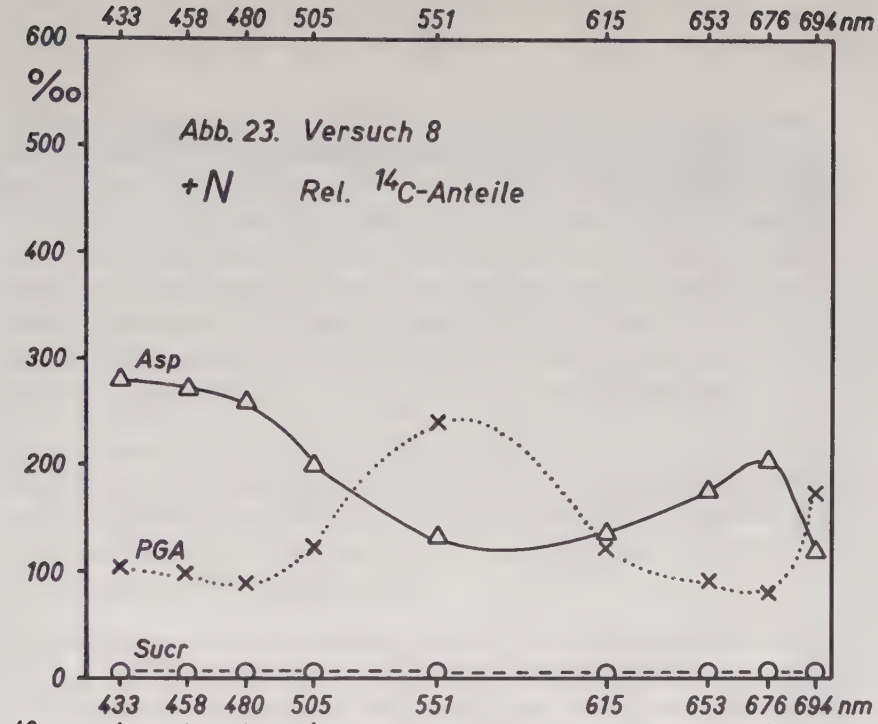


Abb. 23. Versuch 8

+N Rel. ^{14}C-Anteile

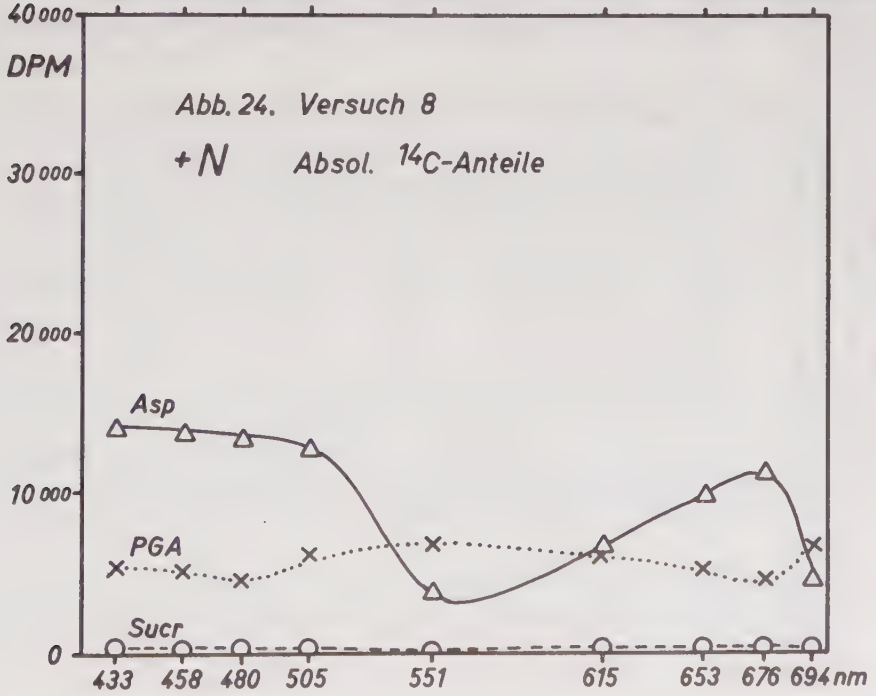


Abb. 24. Versuch 8

+N Absol. ^{14}C-Anteile

λ (nm)	433	458	480	505	551	615	653	676	694	734	Dunkel nach 676	Dunkel
Ala	75	80	97	97	107	88	71	61	60	50	100	30
Thr	11	9	7	7	4	5	4	4	5			
Gly	35	38	43	26	22	29	31	23	25	47	59	28
Ser	52	47	71	52	70	41	35	29	31			
Glu	16	21	20	17	15	14	14	16	20	113	101	127
Asp	68	87	86	85	75	60	55	51	68	327	315	543
Mal	79	72	74	36	31	31	27	27	34	106	103	150
Citr	7	3		2				2	3	17		
PGA	47	33	54	20	28	20	19	9	38	23	45	15
PEP	9	5	10	7	6	6	4	2	4		18	
ZMP	204	162	171	102	103	89	73	70	94	88	114	36
FDP	7	8	11	12	3	4	4	3	2			
UDPG	103	100	88	56	64	52	51	32	80	72	86	28
Sucr	50	125	64	347	389	480	537	595	479	50	41	20
Unbekannt	237	210	204	134	83	81	75	76	57	107	18	23
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tabelle 5 (Versuch 7). Relative ^{14}C-Verteilung auf einzelne Fixierungsprodukte in Promille der Gesamtaktivität der jeweiligen Elektropherogramme nach 10 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Fixierung im quantengleichen monochromatischen Licht von $5{,}42 \cdot 10^{-9}$ Einstein/cm^{2}sec bei mangelhafter N-Versorgung der Algen.

Glutamat sind hier im Blaubereich des Spektrums wieder stärker markiert als im Rotlicht (Tabelle 7 und Abb. 23). Überlagert ist dieser Effekt bei der jetzt höheren Beleuchtungsintensität beim Aspartat aber von einer deutlichen Abhängigkeit des ^{14}C-Einbaues vom Wirkungsspektrum der Photosynthese. Die Markierung von PGA zeigt den entgegengesetzten Verlauf. Malat ist jetzt im Rotlicht stärker als im Blaulicht markiert. Allgemein sind die Unterschiede der Markierung im Blau und Rot weniger ausgeprägt als bei schwächerer Beleuchtung.

Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 734 nm bewirkt eine gegenüber der Dunkelfixierung geringere Steigerung der Phosphatestermarkierung als die einer ^{14}C-Fixierung im Dunkeln vorausgehende Vorbelichtung mit quantengleichem Licht der Wellenlänge 676 nm (Tabelle 5).

CO_2-Gaswechsel- und ^{14}C-Einbaukurve (Abb. 25, Kurven 3 und 4) zeigen wieder gleichartigen Verlauf. Sie haben jetzt auch ein ausgeprägtes Blaumaximum, das jedoch bei der eingestrahlten Beleuchtungsenergie noch nicht ganz die Höhe des Rotmaximums erreicht.

Die nächste Versuchsreihe wurde mit Licht geringerer Intensität ($1{,}25 \cdot 10^{-9}$ Einstein/cm^2sec) bei den Wellenlängen 404, 423, 458, 551 und 676 nm durchgeführt. Da nicht sicher war, ob die Algen nicht auch hier bei der ersten Versuchsdurchführung (Versuch 9) unter Nährsalzmangel standen, wurde auch diese Reihe mit Algen in frischer Nährlösung wiederholt (Versuch 10).

Bei der jetzt angewandten Beleuchtungsstärke wurde der Kompensationspunkt nur noch bei 676 nm gerade erreicht (Abb. 25, Kurven 1 und 2). Ein Blaumaximum ist hier zwar noch deutlich vorhanden, liegt aber im Verhältnis zum Rotmaximum recht niedrig (Vergleich mit den Kurven 3 und 4 des Versuches 8).

Die unterschiedliche ^{14}C-Verteilung unter diesen Bedingungen ist aus den Tabellen 9 und 10 zu ersehen. Zwei Autoradiogramme

λ (nm)	433	458	480	505	551	615
Ala	2775	3520	3783	3589	2354	4048
Thr	407	396	273	259	88	230
Gly	1295	1672	1677	962	484	1334
Ser	1924	2068	2769	1924	1540	1886
Glu	592	924	780	629	330	644
Asp	2516	3828	3354	3145	1650	2760
Mal	2923	3168	2886	1332	682	1426
Citr	259	132		74		
PGA	1739	1452	2106	740	616	920
PEP	333	220	390	259	132	276
ZMP	7548	7128	6669	3774	2266	4094
FDP	259	352	429	444	66	184
UDPG	3811	4400	3432	2072	1408	2392
Sucr	1850	5500	2496	12839	8558	22080
Unbekannt	8769	9240	7956	4958	1826	3726
Total	37000	44000	39000	37000	22000	46000

Tabelle 6 (Versuch 7).
Absoluter ^{14}C-Gehalt der einzelnen Fixierungsprodukte in DPM/10 µl Algenextrakt nach 10 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Fixierung im

653	676	694	734	Dunkel nach 676	Dunkel
3976	4026	2280	42	68	14
224	264	190			
1736	1518	950	40	40	12
1960	1914	1178			
784	1056	760	96	69	57
3080	3366	2584	278	214	244
1512	1782	1292	90	70	68
	132	114	14		
1064	594	1444	20	31	7
224	132	152		12	
4088	4620	3572	75	78	16
224	198	76			
2856	2112	3040	61	58	13
30072	39270	18202	43	28	9
4200	5016	2166	91	12	10
56000	66000	38000	850	680	450

quantengleichen monochromatischen Licht von $5{,}42 \cdot 10^{-9}$ Einstein/cm^2sec bei mangelhafter N-Versorgung der Algen.

λ (nm)	433	458	480	505	551	615	653	676	694	Dunkel
Ala	67	62	62	53	76	69	61	73	70	27
Thr	14	13	13	12	8	11	12	13	8	
Gly + Ser	46	45	45	42	67	62	60	57	63	
Asn	13	11	11	8	3	6	7	10	5	
Glu	40	44	48	52	36	24	23	20	24	144
Asp	280	266	261	200	132	136	176	202	120	604
Mal	68	72	74	87	76	113	103	91	104	60
Citr + Gler	10	16	13	8	6	4	5	5	4	12
PGA	104	100	90	127	245	126	93	83	174	24
PEP		3	5	6	16	6	6	5	7	
ZMP	120	132	130	155	130	142	155	140	148	20
FDP	22	22	20	25	16	38	45	38	38	
UDPG	73	75	64	72	57	68	50	64	60	
Sucr	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Unbekannt	138	134	159	148	127	190	199	194	170	109
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tabelle 7 (Versuch 8). Relative ^{14}C-Verteilung auf einzelne Fixierungsprodukte in Promille der Gesamtaktivität der jeweiligen Elektropherogramme.
Reichliche N-Versorgung der Algen.
Versuchsbedingungen s. Abb. 25, Kurven 3 und 4.

λ (nm)	433	458	480	505	551	615	653	676	694	Dunkel
Ala	3350	3162	3100	2491	2128	3381	3355	4015	2660	25
Thr	700	663	650	564	224	539	660	715	304	
Gly + Ser	2300	2295	2250	1974	1876	3038	3300	3135	2394	
Asn	650	561	550	376	84	294	385	550	190	
Glu	2000	2244	2400	2444	1008	1176	1265	1100	912	134
Asp	14000	13566	13050	9400	3696	6664	9680	11110	4560	562
Mal	3400	3672	3700	4089	2128	5537	5665	5005	3952	56
Citr + Gler	500	816	650	376	168	196	275	275	152	11
PGA	5200	5100	4500	5969	6860	6174	5115	4565	6612	22
PEP		153	250	282	448	294	330	275	266	
ZMP	6000	6732	6500	7285	3640	6958	8525	7700	5624	19
FDP	1100	1122	1000	1175	448	1862	2475	2090	1444	
UDPG	3650	3825	3200	3384	1596	3332	2750	3520	2280	
Sucr	250	255	250	235	140	245	275	275	190	
Unbekannt	6900	6834	7950	6956	3556	9310	10945	10670	6460	101
Total	50000	51000	50000	47000	28000	49000	55000	55000	38000	930

Tabelle 8 (Versuch 8). Absoluter ^{14}C-Gehalt einzelner Fixierungsprodukte in DPM/10 µl Algenextrakt.
Reichliche N-Versorgung der Algen.
Versuchsbedingungen s. Abb. 25, Kurven 3 und 4.

hierzu wurden in einer früheren Arbeit veröffentlicht (84). Die Versuche lassen wieder die Förderung des ^{14}C-Einbaues in Aspartat, Glutamat, Malat und diesmal auch Citrat + Glycerat im kurzwelligen und in Saccharose und Phosphatester (PGA, PEP, ZMP, FDP, UDPG) im langwelligen Teil des Spektralbereichs erkennen.

Bei den mit Puromycin inkubierten Algen (Versuch 9) lag die Gesamtfixierung unter 50 % von der der Kontrollen, so daß die erzielten Markierungsmuster schon aus diesem Grunde dem Dunkelfixierungsmuster näher kommen müssen. Dessen ungeachtet ist auch hier der Quotient der Aspartat- und Saccharose-Markierung infolge des sehr viel stärkeren ^{14}C-Einbaues in Saccharose gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht, wie dies sowohl für die Rotlicht- als auch für die Puromycin-Wirkung als typisch erkannt wurde.

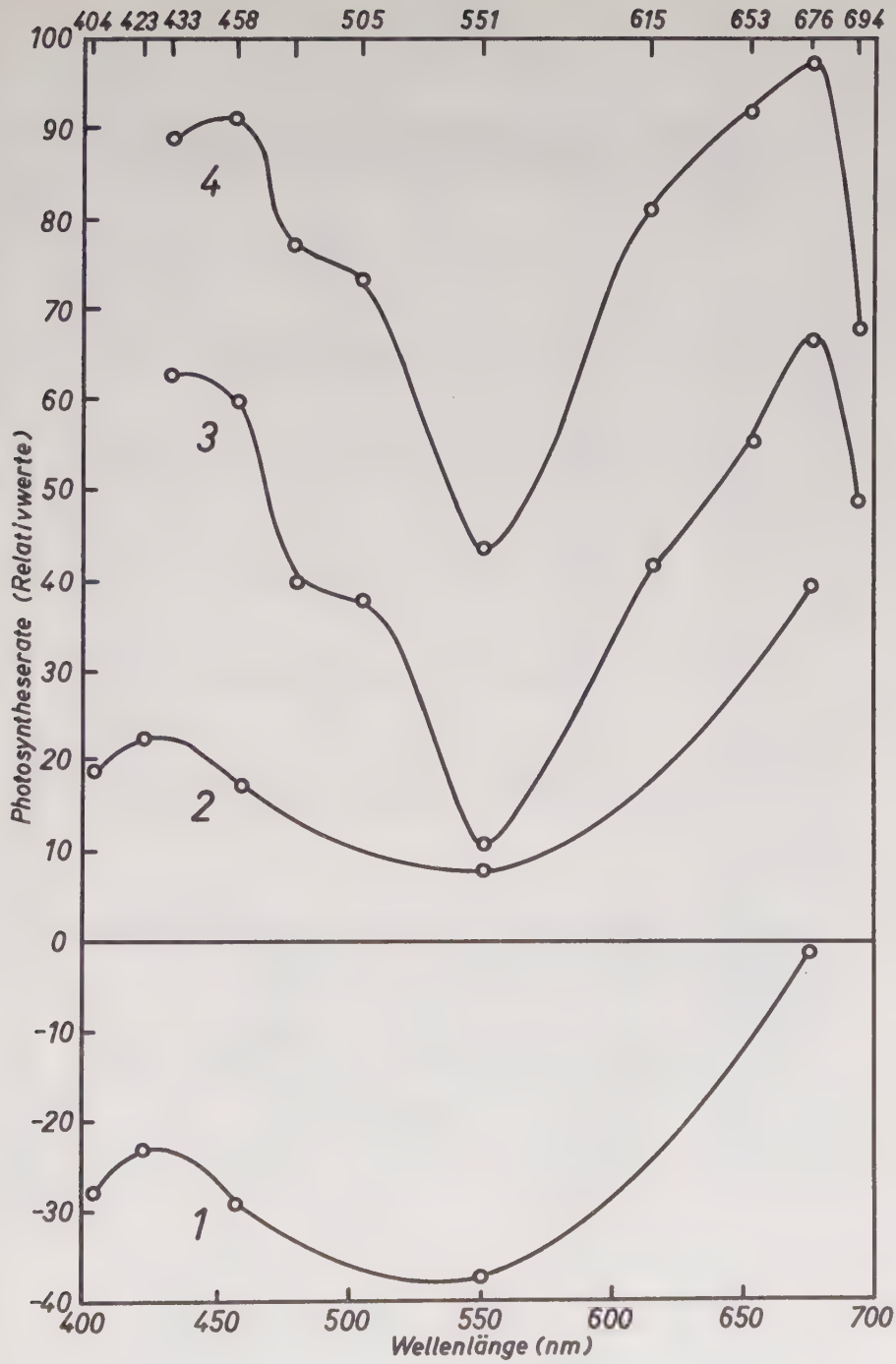
Die anfänglichen Fixierungen bei hohen Beleuchtungsintensitäten im Gasraum (Versuche 1-5) hatten zwar bereits gezeigt,

Abb. 25 (Versuche 8 und 10). →

CO_2-Aufnahme bzw. -Abgabe der Algen, gemessen als CO_2-Abnahme bzw. -Zunahme im Medium, (Kurven 1 u. 3) und ^{14}C-Fixierung, gemessen als Radioaktivität der Algenextrakte, (Kurven 2 und 4) in Abhängigkeit von der Wellenlänge.
Begasung der Algensuspensionen mit Luft mit 0,04 % CO_2 bei 28° C. 10 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Photosynthese im quantengleichen Licht

von $1{,}25 \cdot 10^{-9}$ Einstein/cm^2sec
≙ 3270 erg/cm^2sec bei 458 nm
≙ 2220 erg/cm^2sec bei 676 nm
(Versuch 10, Kurven 1 und 2)

und $5{,}42 \cdot 10^{-9}$ Einstein/cm^2sec
≙ 14170 erg/cm^2sec bei 458 nm
≙ 9610 erg/cm^2sec bei 676 nm
(Versuch 8, Kurven 3 und 4).


404 423 433 458 505 551 615 653 676 694
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
4
3
2
1
Photosyntheserate (Relativwerte)
400 450 500 550 600 650 700
Wellenlänge (nm)

λ (nm)	404	423	458	676	676 Puromycin	458 Puromycin	Dunkel	Dunkel Puromycin
Ala	118	114	98	136	69	74	31	36
Gly + Ser	87	93	68	127	72	47	65	67
Asn					18	7		
Glu	27	32	40	19	92	81	200	210
Asp	183	190	227	88	118	232	342	221
Mal	58	57	63	47	35	60	101	41
Citr + Gler	8	7	11	3	6	18	24	
PGA	44	38	38	53	36	30	3	8
PEP	32	31	30	34	35	20		3
PGlol				12				
ZMP	240	228	217	243	212	219	46	49
FDP	2			2				
UDPG	117	112	119	129	94	86	42	25
Sucr	12	20	17	57	126	35	52	151
Unbekannt	72	78	72	50	87	91	94	189
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tabelle 9 (Versuch 9). Relative ^{14}C-Verteilung auf einzelne Fixierungsprodukte in Promille der Gesamtaktivität der jeweiligen Elektropherogramme nach 15 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Fixierung im quantengleichen monochromatischen Licht von $1{,}25 \cdot 10^{-9}$ Einstein/cm^2sec bei mäßiger N-Versorgung der Algen.

λ (nm)	404	423	458	676	Dunkel
Ala	58	67	63	84	12
Thr	10	9	12	7	
Gly	10	11	11	13	
Ser	30	30	32	26	
Asn	11	9	9	5	
Glu	144	157	155	70	243
Asp	242	218	224	148	555
Mal	63	67	78	45	104
Citr + Gler	27	30	38	11	19
PGA	156	130	132	194	8
PEP	8	6	6	10	
ZMP	83	101	81	153	
FDP		1	1	9	
UDPG	65	63	61	81	
Sucr	5	8	9	52	
Unbekannt	88	93	88	92	59
Total	1000	1000	1000	1000	1000

Tabelle 10 (Versuch 10). Relative ^{14}C-Verteilung auf einzelne Fixierungsprodukte in Promille der Gesamtaktivität der jeweiligen Elektropherogramme.

Reichliche N-Versorgung der Algen. Versuchsbedingungen s. Abb. 25, Kurven 1 und 2.

daß die typischen Unterschiede zwischen Blaulicht- und Rotlichtwirkung auch bei gleichen oder annähernd gleichen Fixierungsraten zu erzielen sind. Die weiteren Fixierungen ließen jedoch deutlich werden, daß im Bereich geringer Beleuchtungsintensitäten eine höhere Fixierungsrate gegenüber einer niedrigeren sich auf die ^{14}C-Verteilung prinzipiell ähnlich wie rotes Licht gegenüber blauem auswirkt. Um sicher den Verdacht ausschließen zu können, bei den Versuchen mit energiegleichem und quantengleichem Licht seien die ausgewiesenen Blaulichtwirkungen a u s s c h l i e ß l i c h auf die im Blaulicht gegenüber Rotlicht geringeren Fixierungsraten zurückzuführen, wurden 2 weitere Fixierungen bei gleicher Fixierungsrate durchgeführt (Versuch 11). Dazu wurde eine durch Vorversuche ermittelte Beleuchtungsintensität eingestellt, bei der sich der Gaswechsel der Organismen im Kompensationspunkt befand.

Wie die Autoradiogramme (Abb. 26 und 27) und Tabelle 11 ausweisen, unterscheiden sich auch hier noch Rot- und Blaulicht-Fixierungsmuster in der im Falle reichlicher Stickstoffversorgung typischen Weise.

d) Farblichtwirkungen auf die ^{14}C-Fixierung chlorophyllfreier Chlorella-Mutanten

Mit der chlorophyllfreien Mutante Chlorella pyrenoidosa M 31 nach BENDIX und ALLEN (10) wurden zweimal ^{14}C-Fixierungen im Gasraum im Farbglasfilterlicht "Rot 630" und "Blau 28" sowie eine Dunkelfixierung durchgeführt (Versuche 12 und 13).

Das Autoradiogramm (Abb. 28) und Tabelle 12 zeigen die resultierende ^{14}C-Verteilung. Die ausgewiesenen Unterschiede in der Markierung sind gering und werden kaum als signifikant angesehen werden können. In Versuch 12 wurden von jedem Algenextrakt 2 Chromatogramme und 3 Elektropherogramme ausgewertet, in Versuch 13 nur je ein Elektropherogramm. Wohl nur daraus erklärt sich hier die etwas größere Streuung der Werte.

Man wird also schließen dürfen, daß die Fixierungen im Blaulicht, im Rotlicht und im Dunkeln gleich ausfallen, daß hier das Licht zumindest unter den Versuchsbedingungen also keinen beträchtlichen Einfluß auf die ^{14}C-Verteilung ausübt.

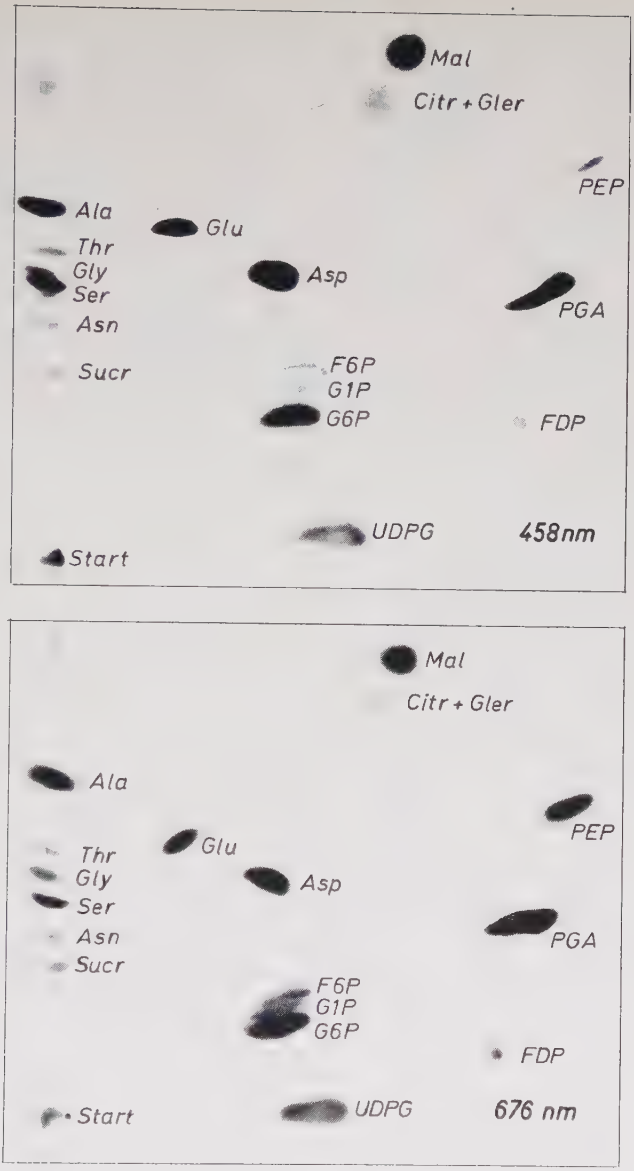


Abb. 26 und 27 (Versuch 11).

Autoradiogramme von Chlorella-Extrakten nach dünnschicht-elektrophoretischer und chromatographischer Auftrennung.
15 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Fixierung in monochromatischem Licht im Kompensationspunkt.

λ (nm)	458	676
Alanin	61	63
Threonin	8	5
Glycin	13	21
Serin	36	35
Asparagin	5	4
Glutamat	89	38
Aspartat	163	126
Malat	96	82
Citrat + Glycerat	27	6
Phosphoglycerat	168	234
Phosphoenolpyruvat	5	13
Phosphoglycolat	1	1
Zuckermonophosphate	138	166
Fructose-1,6-di-phosphat	7	12
Uridindiphospho-glucose	73	84
Saccharose	5	6
Unbekannt	105	104
Total	1000	1000

Tabelle 11 (Versuch 11). Relative ^{14}C-Verteilung auf einzelne Fixierungsprodukte in Promille nach 15 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Fixierung im Kompensationspunkt.
Reichliche N-Versorgung der Algen.
Etwa 5000 erg/cm^{2}sec bei 458 nm
und 1800 erg/cm^{2}sec bei 676 nm.

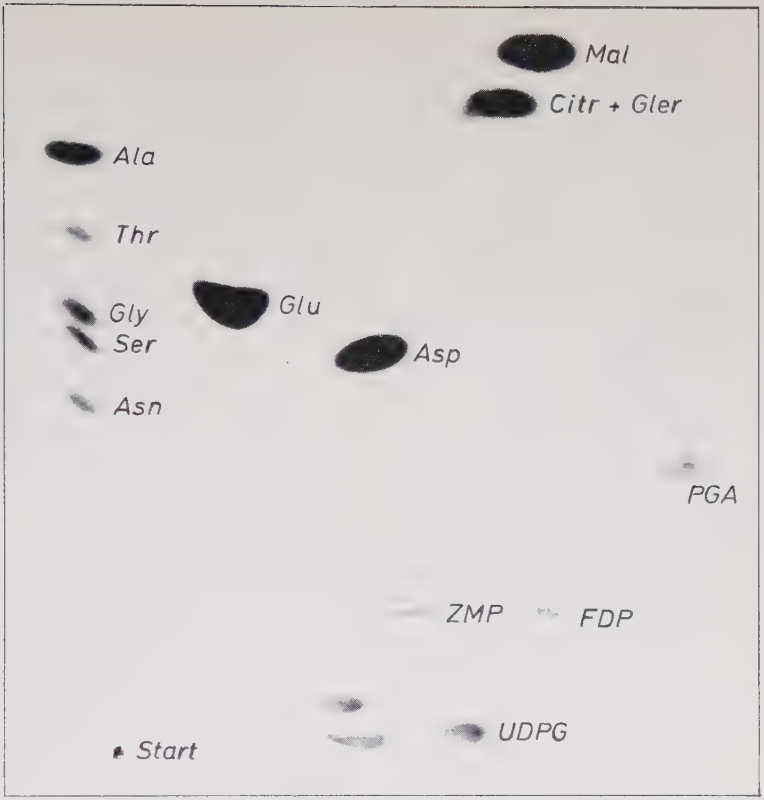


Abb. 28 (Versuch 12). Autoradiogramm des Extraktes einer chlorophyllfreien Chlorella-Mutante nach dünnschicht-elektrophoretischer und -chromatographischer Auftrennung.
15 min Vorbelichtung und 20 min $^{14}CO_2$-Fixierung in blauem Licht.

Mit der Mutante Chlorella vulgaris Nr. 211-11 H/20 des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen wurde nur je eine Fixierung in Suspension bei 458 nm und 676 nm während gleichzeitiger Gaswechselmessungen durchgeführt.

Der CO_2-Verbrauch war bei dieser Alge in Übereinstimmung mit den Ergebnissen KOWALLIKs (53, 56) im Blaulicht gegenüber dem im Rotlicht beträchtlich gesteigert, die Rotlichtatmung dagegen gleich der Dunkelatmung.

	Versuch 12		Versuch 13		
	Rot 630	Blau 28	Rot 630	Blau 28	Dunkel
Ala	33	39	6	6	7
Thr	10	11	4	3	4
Gly + Ser	37	35	59	44	45
Asn	17	17			
Glu	272	273	134	114	133
Asp	177	165	288	274	281
Mal	157	159	51	46	49
Citr+Gler	71	72	30	31	26
P-Ester	99	96	200	237	213
Unbekannt	127	133	228	245	242
Total	1000	1000	1000	1000	1000

Tabelle 12 (Versuche 12 und 13). ^{14}C-Verteilung in Promille auf einzelne Fixierungsprodukte der chlorophyllfreien Chlorella pyrenoidosa-Mutante M 31 nach BENDIX und ALLEN nach 20 min $^{14}CO_2$-Fixierung in rotem (RG 630) und blauem Licht (BG 28) und im Dunkeln.

Wegen der geringen Fixierungsrate mußten hier relativ große Materialmengen verarbeitet werden. Die beiden angefertigten Elektropherogramme waren deshalb infolge des hohen Salzgehaltes der Extrakte technisch schlecht und konnten nur unter Vorbehalt ausgewertet werden. Signifikante Unterschiede der Farblichtwirkungen ließen sich auch bei ihnen nicht feststellen.

IV. Diskussion

a) Der Lichtsteuerung unterworfene Stoffwechselwege

1) Blaulichtwirkung auf die Atmung

Die zunächst überraschende und dem bekannten Wirkungsspektrum der Photosynthese widersprechende Unterdrückung des Blau-Maximums bei niedrigen Beleuchtungsintensitäten läßt sich zwanglos durch die Annahme deuten, daß das schwache Blaulicht durch Verstärkung der CO_2-Abgabe bzw. der Atmung der Organismen die bei dieser Beleuchtungsstärke noch geringe Photosynthese mehr oder weniger kompensiert. Eine derartige Atmungssteigerung durch Blaulicht mit einer Sättigungsgrenze von 500 erg/cm^{2}sec wurde aufgrund andersartiger Methodik (polarographische O_2-Messungen) bereits von KOWALLIK (53, 54, 57) für Chlorella beschrieben. Auch PICKETT und FRENCH (77) sowie RIED (82) berichteten über die gleiche Lichtwirkung. Oberhalb der Sättigungsgrenze dieses Effektes muß sich eine steigende Quantenstromdichte auch im Blaubereich ausschließlich steigernd auf die Photosynthese und damit die CO_2-Aufnahme der Zellen auswirken. Dementsprechend stieg auch in den durchgeführten Versuchen mit steigender Beleuchtungsintensität das Blau-Maximum relativ zum Rot-Maximum der Photosynthese-Kurve immer mehr an.
Im folgenden darf also davon ausgegangen werden, daß im Blaulicht die Atmung sowohl absolut als auch im Verhältnis zur photosynthetischen CO_2-Fixierung verstärkt abläuft.

2) Beziehung zwischen Photosynthese und Atmung

Die weitgehende Übereinstimmung zwischen den Kurven der ^{14}C-Aktivität der Chlorella-Extrakte und den entsprechenden CO_2-Gaswechselkurven läßt auf eine enge Verbindung zwischen Photosynthese und Atmung schließen. Würden fixierte CO_2-Mengen nicht wieder relativ schnell veratmet, würde die Atmung vielmehr aus einem von der Photosynthese nicht unmittelbar abhängigen Pool gespeist, so müßten CO_2-Gaswechselmessungen und ^{14}C-Fixierungs-

raten prinzipiell verschiedene Kurven ergeben. Es müßten dann die Blau-Maxima der ^{14}C-Kurven relativ zu den Rot-Maxima höher liegen als bei den CO_2-Gaswechselkurven, da dann die ^{14}C-Fixierungskurven Ausdruck der reinen Photosynthese wären, die CO_2-Gaswechselkurven jedoch Ausdruck der um die Atmung verminderten Photosynthese sind, die Atmung aber ja im Blaulicht gegenüber der im Rotlicht erhöht ist. Die tatsächliche relative Gleichheit zwischen den Maxima der Gaswechselkurve und denen der ^{14}C-Fixierungskurve läßt sich nur durch die Annahme deuten, daß die im Laufe der Atmung freigesetzten CO_2-Mengen frühen Fixierungsprodukten entstammen.

3) Synthese der C_4-Dicarbonsäuren

Damit erhebt sich die Frage, welchen Weg bzw. welche Verbindungen der photosynthetisch assimilierte Kohlenstoff durchläuft, wenn er zum Atmungssubstrat wird.

Die vorliegenden Markierungsmuster lassen vermuten, unter Bedingungen, welche die Atmung relativ zur Photosynthese begünstigen (blaues Licht gegenüber rotem, schwächere Beleuchtung gegenüber stärkerer im Bereich der schwachen Intensitäten), werde der C-Einbau insbesondere in Aspartat, Glutamat und Malat begünstigt.

Für die Synthese dieser Säuren ist eine 2. Carboxylierungsreaktion im Anschluß an den CALVIN-Cyclus anzunehmen: 3-Phosphoglycerat (z.B. durch Carboxylierung aus Ribulosediphosphat entstanden) wird über 2-Phosphoglycerat in Phosphoenolpyruvat und dieses durch Carboxylierung in Oxalacetat überführt, das leicht in die anderen C_4-Dicarbonsäuren übergehen kann, z.B. durch Reduktion in Malat oder durch Transaminierung oder reduktive Aminierung in Aspartat. Dabei kann außerdem aus Phosphoenolpyruvat durch Dephosphorylierung und Transaminierung Alanin entstehen. Diese Reaktionsfolge dürfte dem experimentellen Befund am zwanglosesten gerecht werden, daß bei $^{14}CO_2$-Photosynthese-Versuchen Phosphoenolpyruvat, Malat, Aspartat und Alanin schon nach kurzer Fixierungsdauer gleich nach den Phosphatestern des CALVIN-Cyclus markiert erscheinen. Lang-

samer wird Glutamat markiert, das vermutlich aus Oxalacetat auf dem Wege über den KREBS-Cyclus entsteht.

Es hat sich gezeigt, daß der CO_2-Einbau von Phosphoenolpyruvat unter Bildung von Oxalacetat die wichtigste Dunkel-Carboxylierungsreaktion im Pflanzenreich ist. Seit BANDURSKI und GREINER 1952 in Spinatblättern ein Enzym fanden, das die Reaktion

$$PEP + CO_2 + H_2O \longrightarrow \text{Oxalacetat} + H_3PO_4 \quad (\Delta F^b = -5{,}7 \text{ kcal})$$

katalysiert (3, 4, 100, 101, 108), wurde diese Phosphoenolpyruvat-Carboxylase in zahlreichen Pflanzengeweben festgestellt, und SPLITTSTOESSER wies nach, daß die CO_2-Dunkelfixierung für Proteinsynthese und Wachstum dieser Gewebe notwendig ist (96). Die quantitativ größte Rolle spielt diese Carboxylierung im Säurestoffwechsel vieler Sukkulenten (14, 19, 23, 49, 81).

Zuckerrohr, Mais und einige andere Gramineen sowie sehr wenige Dicotylen (Amaranthus, Atriplex) fixieren alles Kohlendioxid auch im Licht ausschließlich auf diesem Wege nach dem HATCH-SLACK-Schema (30, 31, 32, 50, 75, 93) und regenerieren dabei das Phosphoenolpyruvat in einem Kreisprozeß. Aber auch für die Pflanzen, die CO_2 überwiegend über den CALVIN-Cyclus (6, 17, 18, 64) fixieren, wird von den meisten Autoren angenommen, daß sie daneben zur Synthese der C_4-Dicarbonsäuren auch im Licht Phosphoenolpyruvat carboxylieren (7, 18, 116). Nach WALKER (116) sinkt die CO_2-Fixierung grüner Pflanzen im Dunkeln auf 1 % oder weniger des während der Photosynthese möglichen Maximalbetrages ab, während im Licht die "Dunkelfixierung", d. h. die Phosphoenolpyruvat-Carboxylierung, 3 - 12 % der gesamten CO_2-Fixierung ausmacht.

Um zusätzliche Sicherheit hinsichtlich dieses Entstehungsweges der C_4-Dicarbonsäuren zu erhalten, wurde je einer Algenprobe einige Stunden vor der $^{14}CO_2$-Photosynthese unmarkiertes 2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat zugesetzt. Als Wirkung war eine vermehrte Produktion der aus Phosphoglycerat unmittelbar hervorgehenden Stoffwechselprodukte zu erwarten, von denen jedoch nur diejenigen zusätzlich markiert erscheinen konnten, die durch eine zusätzliche $^{14}CO_2$-Aufnahme entstanden. Tatsächlich

zeigte dann Malat - dem in Betracht gezogenen Syntheseweg entsprechend - sowohl im Blau- als auch im Rotlicht einen signifikant höheren ^{14}C-Einbau als in den übrigen Proben (Tab.1). Daß dabei 2-Phosphoglycerat keinen größeren Effekt als 3-Phosphoglycerat hatte, wird als Hinweis dafür genommen werden können, daß die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat in 2-Phosphoglycerat unter der Wirkung der Phosphoglyceratmutase keine die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat limitierende Reaktion ist.

Damit erscheint der Entstehungsweg dieser Säuren, der im folgenden kurz als "Säurefixierung" bezeichnet sei, wohl als ziemlich gesichert. Da offenbar Bedingungen, welche die Markierung der Dicarbonsäuren fördern, die von Phosphoenolpyruvat (wie die von PGA) herabsetzen (s. z.B. Tab.7 u. Abb.26,27), ist zu vermuten, daß der entscheidende blaulichtgeförderte Schritt auf diesem Synthesewege die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat ist.

4) Atmung und Säurefixierung

Wir hatten gesehen, daß einige Bedingungen, welche die Atmung relativ zur Photosynthese begünstigen, auch die Säurefixierung fördern. Es fragt sich deshalb, ob starke Markierung von Aspartat, Glutamat und Malat ein allgemeinerer Hinweis auf eine relativ zur photosynthetischen CO_2-Aufnahme starke Atmung ist. Das sei an einigen Beispielen geprüft.

Im Dunkeln sind die Organismen nur zur Atmung, nicht zur Photosynthese befähigt; es ist also nur Säurefixierung zu erwarten. Tatsächlich werden im Dunkeln ganz überwiegend Aspartat, Glutamat und Malat markiert. Alle Phosphatester zeigen demgegenüber einen recht unbedeutenden ^{14}C-Einbau.

Ebenfalls nur zur Atmung sind chlorophyllfreie Mutanten befähigt. Tatsächlich zeigen auch sie ein ähnliches ^{14}C-Einbaumuster wie die grünen Chlorellen im Dunkeln. Das Fixierungsmuster dieser Mutanten konnte auch durch Farblicht nicht geändert werden.

Ähnlich müßten sich nun nach den gewonnenen Vorstellungen grüne Chlorellen im Licht verhalten, deren Photosynthese durch einen Inhibitor völlig gehemmt ist. Dem scheinen allerdings die

Ergebnisse von OGASAWARA und MIYACHI (71) zunächst zu widersprechen, nach denen mit CMU behandelte Chlorella ellipsoidea unterschiedlichen ^{14}C-Einbau zeigte, je nachdem, ob im Dunkeln, im Rotlicht (679 nm) oder im Blaulicht (453 nm) fixiert wurde. Der wesentlichste farblichtbedingte Unterschied bestand jedoch in einer Verdoppelung der gesamten Fixierungsrate durch Blaulicht gegenüber der Dunkelfixierung und einer annähernden Verdoppelung gegenüber Rotlicht. Die relativen Unterschiede in der Markierung der Einzelsubstanzen sind demgegenüber wesentlich kleiner und erklären sich vielleicht durch eine minimale, trotz der Hemmung noch verlaufende Photosynthese, wofür besonders die sowohl im Blau- als auch im Rotlicht ausgewiesene Erhöhung der Phosphatester-Markierung spricht. Im übrigen aber werden unter diesen Bedingungen wie bei den eigenen Dunkelfixierungen Aspartat und Glutamat am stärksten und Malat noch beträchtlich markiert, gleichgültig, ob im Blau, im Rot oder im Dunkeln fixiert wurde.

EL-HISSY (24) fand bei Pilzen farblichtbedingte Unterschiede in der Markierung einzelner Aminosäuren und organ. Säuren. Die hinsichtlich dieser Säuren sehr viel differenzierteren, praktisch aber phosphatesterfreien Einbaumuster dieser andersartigen Organismen lassen sich jedoch wohl kaum noch mit denen von Chlorella vergleichen, wenn auch bei den Pilzen der CO_2-Einbau ebenfalls über die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat verlaufen dürfte.

Werden nun grüne, ungehemmte Chlorellen belichtet, so muß im Schwachlichtbereich mit steigender Photosynthese die Markierung von Phosphatestern gegenüber der Säurefixierung beträchtlich zunehmen, wenn die Annahme richtig ist, das Verhältnis zwischen Atmung und Photosynthese bestimme die Fixierungsmuster. Daß dies der Fall ist, zeigte z. B. Versuch 6 (Abb. 11 - 20) sehr deutlich.

Wird im Blaulicht die pro Flächeneinheit eingestrahlte Energie so weit über die im Rot eingestrahlte hinaus erhöht, daß gleiche Fixierungsraten erzielt werden, so wird infolge der Atmungsaktivierung durch das kurzwellige Licht die Atmung

relativ zur Photosynthese im Blau immer noch stärker sein als im Rot. Deshalb ist auch unter diesen Bedingungen noch im kurzwelligen Licht eine verstärkte Säurefixierung zu erwarten. Daß sie tatsächlich eintritt, zeigen die Versuche 1-5 (Tabellen 1 und 2) und Versuch 11 (Tabelle 11).

Im Bereich mittlerer und hoher Beleuchtungsintensitäten kann sich der Blaulichteffekt auf die Atmung, der ja schon bei 500 erg/cm^{2}sec seine Sättigung erreicht (53), trotz absolut gleicher Größe nur noch relativ schwächer auf die Fixierungsmuster auswirken, die deshalb jetzt hinsichtlich der unterschiedlichen Wirkung der Lichtfarben eine graduelle Nivellierung erfahren.

Ob bei hohen Beleuchtungsintensitäten auch bei Chlorella eine beträchtliche Steigerung der Atmung erfolgt, wie sie für höhere Pflanzen als "Lichtatmung" oder "Photorespiration" nachgewiesen ist, muß wohl als noch nicht geklärt gelten, da Chlorella zu den Pflanzen mit sehr niedriger CO_2-Kompensationslage gehört, bei denen keine CO_2-Abgabe an ein CO_2-freies Medium im Licht erfolgt, deren Größe bei höheren Pflanzen als Maß für die Lichtatmung genommen wird. FOCK konnte jedoch mit einer besonderen Methodik bei Pflanzen ohne lichtbedingte CO_2-Entwicklung eine starklichtabhängige O_2-Aufnahme nachweisen (27), die auch für diese Organismen auf eine beträchtliche Photorespiration schließen läßt.

Auf jeden Fall ist im Bereich höherer Beleuchtungsintensitäten die Kurve der relativen Aspartat-Markierung deutlich vom Wirkungsspektrum der Photosynthese mitgeprägt (Abb. 23, 24; S.41). Sollte deshalb im Starklicht eine Korrelation zwischen Photosynthese und Atmung gegeben sein, so muß man diese auch zwischen Säurefixierung und Atmung annehmen.

Zusammenfassend wird man sagen dürfen, daß die Ergebnisse für eine enge Beziehung zwischen Säurefixierung und Dunkelatmung sowie blaulichtaktivierter Atmung sprechen. Darüberhinaus könnte die Säurefixierung auch mit einer starklicht- oder photosyntheseabhängigen Atmung korreliert sein, die aber als solche bei Chlorella noch nicht eindeutig nachgewiesen wurde.

5) Stickstoff-Einbau

Eine sehr große Rolle für den C-Einbau spielt der N-Stoffwechsel der Pflanze.

Hinsichtlich der eigenen Ergebnisse muß aber zunächst einschränkend gesagt werden, daß keine Versuche mit d e f i n i e r t e n N-Mangelkulturen gemacht wurden. Dennoch soll im folgenden von der Annahme ausgegangen werden, ein Teil der Kulturen, mit denen die Experimente durchgeführt wurden, seien N-Mangelkulturen gewesen. Dies bedarf einer Rechtfertigung: Der bereits erwähnte beträchtliche pH-Anstieg, der sicher auftrat, wenn eine für einige Tage nicht verdünnte Chlorella-Kultur hoher Zelldichte ohne CO_2-Begasung blieb (S.8), kann nur entweder durch eine selektive Anionen-Aufnahme oder eine selektive Kationen-Abgabe der Algen erklärt werden. Als ausscheidbare Kationen kommen wohl höchstens Ammonium-Ionen in Betracht. Eine NH_4^+-Exkretion würde aber bedeuten, daß vom Organismus reduzierter Stickstoff nicht assimiliert werden kann. Sie würde damit auch eine Störung des N-Haushaltes zum Ausdruck bringen. Wahrscheinlicher ist unter den gegebenen Kulturbedingungen aber eine selektive Anionen-Aufnahme. Als Anionen befanden sich überwiegend Nitrat-, weniger Phosphat- und vergleichsweise wenig Sulfat-Ionen im Medium (s. Nährlösungsrezept S. 6). Einige der erzielten Ergebnisse lassen sich nun aber völlig zwanglos - besonders auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren (13, 113) - als Konsequenzen von N-Mangel deuten.

Nach STROTMANN (98) wird Chlorella-Suspensionen zugesetzter Nitrit-Stickstoff im Licht schnell und restlos in organische Bindung überführt. Dabei muß zwischen der Nitrit-Reduktion und der Reaktion, die den anorganischen Stickstoff in organische Bindung überführt, eine enge Koppelung bestehen, die bewirkt, daß nicht mehr Nitrit reduziert wird, als in organische Substanzen eingebaut werden kann. Damit ist die Menge des aufgenommenen Stickstoffs abhängig von der Zahl der Akzeptormoleküle, die z.B. der CALVIN-Cyclus liefert. Tatsächlich kann mit der Drosselung des Zustromes von Photosynthese-Produkten die

Nitrit-Reduktionsrate gesenkt werden. So erfolgt im CO_2-freien Medium im Licht keine beträchtliche N-Reduktion (48). STROTMANN konnte zeigen, daß z.B. die Hemmung des CALVIN-Cyclus durch Jodacetamid eine gleichartige Hemmwirkung wie der Entzug von CO_2 auf die Kinetik der Nitrit-Reduktion ausübt. Dabei werden in beiden Fällen die offenbar aus einem Reservepool gespeiste Initialphase der Nitritaufnahme im Licht und die Nitrit-Reduktion im Dunkeln kaum, die stationäre Lichtphase dagegen beträchtlich oder völlig gehemmt (98).

Ist nun die CO_2-Reduktion einerseits Voraussetzung für eine erhebliche N-Aufnahme der Algen, so ist sie andererseits doch auch Konkurrenzreaktion für sie, da beide Reaktionen der photosynthetisch gewonnenen Reduktionsäquivalente bedürfen. Deshalb bewirkt Nitrit- oder Nitratzugabe bei niedriger Beleuchtungsstärke eine Senkung der CO_2-Fixierungsrate (33, 70). Damit wird deutlich, daß über die N-Reduktion eine besondere Möglichkeit der Stoffwechselsteuerung gegeben ist.

Es stellt sich jetzt die Frage, welche Verbindung durch das Ausmaß ihrer Synthese als N-Akzeptor bestimmend für den Umfang der N-Reduktion sein könnte, bzw. welche Substanz umgekehrt in Abhängigkeit vom Ausmaß der N-Assimilation synthetisiert werden könnte.
Da die Nitritreduktion im Licht photosyntheseabhängig ist, kommt als dieser N-Akzeptor nur ein Photosyntheseprodukt, d.h. eine frühzeitig ^{14}C-markierte Substanz in Betracht. Zwar könnte der reduzierte Stickstoff zuvor von einer Verbindung übernommen werden, deren Pool photosyntheseunabhängig ist, müßte dann aber doch schnell auf ein fruh markiertes Produkt übergehen, dessen Synthese geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Markierung dieser Substanz müßte in Anbetracht des ganz erheblichen Stickstoffeinbaues beträchtlich sein. Schließlich müßte die Markierung dieser Verbindung im Dunkeln relativ stärker als im Licht erfolgen, da der N-Einbau im Dunkeln gegenüber dem im Licht nicht im gleichen Verhältnis herabgesetzt wird wie der C-Einbau.
Die einzigen Fixierungsprodukte, die diese Bedingungen uneingeschränkt erfüllen, sind Aspartat und Glutamat.

Nach BASSHAM und KIRK ist die reduktive Aminierung von α-Ketoglutarat unter Bildung von Glutamat bei Chlorella vermutlich der erste N-Einbauschritt (8). Die Aminogruppe kann jedoch unter der Wirkung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase leicht ausgetauscht werden. Die Kinetik der ^{14}C-Markierung von Aspartat und Glutamat läßt jedenfalls vermuten, daß die Synthese von Oxalacetat in entscheidenderem Maße als die von α-Ketoglutarat der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Das gilt selbstverständlich besonders dann, wenn man annimmt, daß Glutamat aus Oxalacetat über den KREBS-Cyclus hervorgeht.

Wie die in den Tabellen wiedergegebenen Markierungsmuster zeigen, findet sich nach Dunkelfixierung in der Regel über 50 % des fixierten ^{14}C in Aspartat, ein weiterer beträchtlicher Teil in Glutamat. Auch im schwachen Licht bleibt Aspartat immerhin zunächst die stärkst markierte Einzelverbindung.

Wenn nun den beiden Aminosäuren die beschriebene Rolle im Stoffwechsel zukommt, so muß absinkender Nitratgehalt der Nährlösung ihren ^{14}C-Einbau herabsetzen. In Versuch 7 (Tabelle 5) kamen Algen mit erschöpfter, in Versuch 8 (Tabelle 7) mit frischer Nährlösung zur Verwendung. Ein Vergleich zeigt sofort, daß der N-Mangel sich stark senkend nur auf die relative Markierung von Aspartat und Glutamat ausgewirkt hat, während Alanin, Glycin und Serin in Versuch 7 gegenüber Versuch 8 sogar einen höheren relativen ^{14}C-Einbau aufweisen. Hieraus lassen sich nun zwar ohne Kenntnis der genauen Kinetik der Markierung der Substanzen und ihrer gesamten Poolgrößen bzw. ihrer spezifischen Aktivitäten keine zwingenden Schlüsse ziehen. Dennoch legt dieses Resultat die Vermutung nahe, daß Aspartat und Glutamat infolge des N-Mangels vermindert synthetisiert werden, daß die Synthese der übrigen Aminosäuren dagegen nicht u n m i t t e l b a r abhängig vom Stickstoffeinbau der Zelle ist, daß bei ihnen vielmehr ein leichter Aufstau durch verringerten Einbau in Proteine und Nucleinsäuren erfolgt.

Nach AHMED erreicht bei Lichtfixierung der ^{14}C-Einbau in Aspartat und Malat im Lebenscyclus synchronisierter Chlorellen

sein Maximum während und kurz nach der Freisetzung der Autosporen in der Dunkelphase und sein Minimum in der zweiten Hälfte der Lichtphase (1). Hiermit korreliert praktisch völlig die Aktivität der lichtabhängigen Nitritaufnahme von Chlorella in Abhängigkeit von der Entwicklungsphase der synchronisierten Zellen nach STROTMANN (98).

Am bemerkenswertesten aber ist wohl, daß STROTMANN und RIED (99) eine Abhängigkeit der Nitritreduktion bzw. des N-Einbaues von der Farbe und Intensität des Lichtes nachweisen, die weitgehend mit der von KOWALLIK (53, 56), RIED (82) sowie von PICKETT und FRENCH (77) festgestellten Abhängigkeit der Atmung von den gleichen Faktoren übereinstimmt und eine Erklärung für die im Blau- und Rotlicht unterschiedlichen ^{14}C-Markierungsmuster geben könnte:

Nach STROTMANN und RIED steigert schwaches Blaulicht (unterhalb 500 nm) die atmungsabhängige Nitritaufnahme in kinetisch sehr ähnlicher oder gleicher Weise wie die respiratorische O_2-Aufnahme selbst. Für beide Beleuchtungseffekte besteht die gleiche spektrale Abhängigkeit (Maxima zwischen 400 und 480 nm, steiler Abfall bei 500 nm), die gleiche Empfindlichkeit gegen Antimycin A und die gleiche Unempfindlichkeit gegen DCMU. Beide Effekte sind vom Sauerstoffgehalt des Mediums abhängig. O_2-Entzug verhindert beide völlig, wie jede andere Atmungshemmung in gleicher Weise auf beide negativ wirkt.

Demgegenüber wird die photosynthetische Nitritreduktion von der CO_2-Konzentration und durch Starklicht in Abhängigkeit von dessen Intensität stimuliert. Das Aktionsspektrum dieses Effektes entspricht dem der Photosynthese, wenn kein Sauerstoff im Medium ist. Ist O_2 zugegen, so überlagern sich Starklicht- und Schwachlichteffekt. Offen bleibt dabei wiederum nur, ob die erwähnte (S. 62), bei höheren Pflanzen sicher auftretende photosynthesebedingte Starklichtaktivierung der Atmung auch bei Chlorella erfolgt. In diesem Falle wären auch im Starklicht Atmung, N-Einbau und Markierung der Dicarbonsäuren miteinander korreliert. Die O_2-Unabhängigkeit der pho-

tosyntheseabhängigen Nitritreduktion zeigt allerdings wohl, daß eine n o t w e n d i g e Korrelation zwischen dieser und der Atmung nicht gegeben ist. Das schließt aber die Möglichkeit nicht aus, daß sie unter physiologischen Bedingungen, d. h. bei Gegenwart von Sauerstoff im Medium, praktisch doch vorliegt.

Wenn nun diese Beobachtungen und Überlegungen richtig sind, können sie weitgehend die lichtabhängigen Unterschiede im C-Einbau erklären, die in den hier wiedergegebenen Markierungsmustern zum Ausdruck kommen: Da die Nitritreduktion der aus der Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat hervorgegangenen Dicarbonsäuren als N-Akzeptoren und möglicherweise die Atmung dieser Säuren als Substrat bedarf, muß ein durch schwaches Blaulicht hervorgerufener verstärkter Stickstoffeinbau und damit eine verstärkte Atmung mit einer erhöhten Synthese von Dicarbonsäuren und damit einer erhöhten Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat gekoppelt sein. Diese kann im Licht nur auf Kosten der Phosphatester des CALVIN-Cyclus erfolgen.

Unter Starklichtbedingungen werden die Verhältnisse komplizierter. Der Schwachlichteffekt des Blaulichtes bleibt zwar erhalten, d.h. Aspartat und Glutamat werden im Blaulicht stärker markiert als im Rotlicht. Es kommt jetzt aber auch die Photosynthese-Abhängigkeit des N-Einbaues zum Ausdruck: Die Kurve der relativen ^{14}C-Markierung von Aspartat folgt jetzt deutlich dem Wirkungsspektrum der Photosynthese (Abb. 23, S.41). Im übrigen scheint unter Starklichtbedingungen bei reichlicher Stickstoffversorgung die Aminierung von Oxalacetat kompetitiv hinsichtlich der Reduktion zu Malat zu erfolgen: In Übereinstimmung mit den einleitend (S. 3/4) erwähnten Ergebnissen VOSKRESENSKAYAs wird unter diesen Bedingungen Malat im Rotlicht oft stärker als im Blaulicht markiert (Tabelle 7, S. 46).

Im Sinne unserer Deutung kann auch der Einfluß von Kohlendioxid im Medium beleuchteter Chlorellen auf die ^{14}C-Markierungsmuster gesehen werden: Nach TRUKHIN (106) hebt hoher CO_2-Gehalt (über 1 Vol.-%) der zur Begasung der Chlorella-Suspensionen

verwendeten Luft die unterschiedliche Wirkung roten und blauen Lichtes auf die chemische Zusammensetzung der Zellen auf. Verringerung des CO_2-Gehaltes führt zu einer Abnahme des gesamten Stickstoffgehaltes und zu einer Zunahme der Kohlenhydrate in der Zelle. Dieser Effekt wird besonders einleuchtend, wenn man sich vor Augen hält, daß die N-Akzeptormoleküle zu ihrer Synthese im Anschluß an den CALVIN-Cyclus einer zweiten Carboxylierung bedürfen.

Es bleiben jetzt noch die Bedingungen der Saccharose-Synthese zu erörtern. Dazu seien die Ergebnisse von Versuch 7 und 8 (Tabellen 5-8, Abb. 21-24) verglichen. Beide Versuche wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt, jedoch fanden für Versuch 7 Algen in einer erschöpften Nährlösung, für Versuch 8 dagegen solche in einem frischen Nährmedium Verwendung. Wie das Ergebnis von Versuch 8 zeigt, wird bei reichlicher Stickstoffversorgung der Organismen die Saccharose nur minimal markiert, und selbst im Rotlicht muß dann ihr ^{14}C-Gehalt nicht signifikant erhöht sein. Insoweit stimmt dies mit den Resultaten einer Arbeit VOSKRESENSKAYAs und GRISHINAs (1958) an höheren Pflanzen überein, wonach die unterschiedlichen Farblichtwirkungen nur bei knapper Stickstoffversorgung der Pflanzen manifest werden sollen (113). Bei erschöpfter Nährlösung dagegen (Versuch 7) ist schon im Blaulicht Saccharose nicht unbeträchtlich markiert. Wird jetzt die N-Einbaurate durch Rotlicht (d.h. fehlendes Blaulicht) weiter herabgesetzt, so kommt es zu einer extremen Saccharose-Synthese.

Der Vergleich der Markierungskurven (Abb. 21-24) macht eindringlich klar, welch krasse Unterschiede die ^{14}C-Verteilung erfährt, je nachdem, ob reduzierter Stickstoff oder die "assimilatory power" der begrenzende Faktor ist: Bei N-Mangel bewirkt jede Erhöhung der C-Reduktionsrate (z.B. im Rotgipfel bei 676 nm) verstärkten C-Abfluß aus dem CALVIN-Cyclus in den Saccharose-Pool, weil der reduzierte Kohlenstoff nicht mehr für sinnvollere Synthesen (N-Verbindungen) Verwendung finden kann. Bei reichlichem N-Angebot dagegen bestimmt die photosyntheseabhängige Menge an energiereichem Phosphat und reduziertem Pyridinnucleotid das Ausmaß des N-Einbaues, wie die Kurve der

Aspartat-Markierung deutlich werden läßt. Dabei kommt es im Photosynthese-Minimum bei 551 nm zu einem relativen Aufstau von Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat (Tab. 7), die unter diesen Bedingungen offenbar nur noch verringert über Oxalacetat in Aspartat übergehen können, während PGA aber andererseits auch nur noch verringert zu Zuckerphosphaten reduziert wird.

Weiteren Aufschluß gab die Inkubation der Algen mit Puromycin, einem spezifischen Inhibitor der Proteinsynthese. Dieser Hemmstoff steigerte in allen Fällen seiner Anwendung ebenfalls die Saccharose-Markierung (Tabellen 1 u. 9). Damit darf als sehr wahrscheinlich gelten, daß starke Saccharose-Markierung Ausdruck gehemmter Proteinsynthese ist. Ganz allgemein scheint der Quotient aus Aspartat- und Saccharose-Markierung ein geeigneter Index der relativen Proteinsynthese zu sein (2, 83). Wenn dieser Quotient in einer Chlorella pyrenoidosa-Dauerlichtkultur bei 1 oder noch niedriger liegt, so ist der Stickstoffhaushalt gestört.

Allgemein darf jetzt gesagt werden: Primärer Ausdruck der Größe der N-Einbaurate ist die Markierung von Aspartat. Bei leichtem Stickstoffmangel, verursacht durch N-Mangel im Medium oder durch zu geringe Aktivität der Nitratreduktion, z.B. infolge fehlenden Blaulichtes, verringert sich der C-Einbau in Aspartat zu Gunsten einer stärkeren Markierung der Phosphatester des CALVIN-Cyclus. Erfolgt nun eine weitere Verschlechterung der Stickstoffversorgung, so wird die Proteinsynthese beträchtlich herabgesetzt. Damit fehlt dann eine wesentliche "Abflußmöglichkeit" für den im CALVIN-Cyclus fixierten Kohlenstoff, der sich aufstaut. Der bei allzu großem Aufstau eingeschlagene "Ersatz-Abflußweg" ist die Saccharose-Synthese. Erhöhte Saccharose-Markierung ist damit sekundärer Ausdruck des Stickstoffmangels.

6) Lichtatmung und Glycolat-Stoffwechsel

Die gegebene Deutung der vorliegenden Ergebnisse scheint zunächst in Widerspruch zu stehen mit einer viel diskutierten Hypothese, nach der Glycolat das Substrat der Atmung im Licht ist. Diese Hypothese entstand im Anschluß an eine Reihe be-

merkenswerter Einsichten in die Beziehungen zwischen Photosynthese und Atmung, die im Laufe der letzten Jahre unter dem Stichwort "Lichtatmung" oder "Photorespiration" veröffentlicht wurden (15, 16, 27, 28, 59, 79, 105, 123).

ZELITCH nimmt an, daß Glycolat durch O_2 zu Glyoxylat und H_2O_2 oxidiert wird und daraus autokatalytisch Formiat, CO_2 und Wasser entstehen (125, 126). Für die Funktion von Glycolat als Atmungssubstrat spricht u.a., daß nach ZELITCH die Blockierung der Glycolat-Oxydase durch einen geeigneten Inhibitor zu einer beträchtlichen Steigerung der Netto-CO_2-Fixierung führt (126), und daß Bedingungen, welche die Lichtatmung fördern, wie niedriger CO_2- und hoher O_2-Partialdruck im Medium, auch die Entstehung von Glycolat begünstigen.

Damit ist die Beteiligung von Glycolat als Substrat der Lichtatmung zwar nicht bewiesen, aber doch sehr wahrscheinlich. Aus der in den eigenen Versuchen erzielten Glycolat-Markierung sollen hierzu wegen der Flüchtigkeit der Glycolsäure keine Schlüsse gezogen werden. Erwähnt sei nur, daß beträchtliche Glycolat-Markierung immer nur unter Starklichtbedingungen registriert werden konnte. In diesem Zusammenhang ist aber auch die Markierung von Glycin und Serin als möglichen Zwischenprodukten des "glycolate pathway" (21, 22, 73, 74, 80, 102, 117, 118, 120, 121) von Bedeutung. Im Zuge dieses Stoffwechselweges sollen beträchtliche Mengen Kohlenstoff über Glycolat → Glyoxylat → Glycin → Serin - und vielleicht Hydroxypyruvat und Glycerat - sogar in Kohlenhydrate eingebaut werden können. In den eigenen Experimenten wurde mit steigender Photosynthese bzw. im Rotlicht Glycin im Verhältnis zu Serin meist stärker markiert. Dies wird verständlich, wenn man annimmt, daß Glycin ausschließlich aus Glycolat entsteht, Serin jedoch daneben auch noch aus 3-Phosphoglycerat über 3-Phosphohydroxypyruvat (18, 94, 115) hervorgeht, und wenn man den Glycolatstoffwechsel als typisch photosynthese- bzw. starklichtabhängig ansieht.

Es besteht nun durchaus die Möglichkeit, daß sowohl der Glycolatstoffwechsel als auch der Stoffwechsel der Dicarbonsäuren mit der Atmung im Licht korreliert sind. Denn einerseits erscheinen die Argumente für das Glycolat als Substrat der Photorespiration überzeugend, andererseits ist aber bei Chlorella die Parallelität zwischen atmungsfördernden Bedingungen und der relativen Markierung insbesondere von Aspartat, Glutamat und Malat unübersehbar. Vielleicht darf man nach allem annehmen, daß allgemein Atmung, Stickstoffeinbau und Dicarbonsäureweg miteinander korreliert sind und daß darüber hinaus besonders im Starklicht der Glycolatstoffwechsel zusätzliches Atmungssubstrat liefert. Zu ähnlichen Vorstellungen könnten auch die neuesten Ergebnisse von VOSKRESENSKAYA et al. (115) führen.

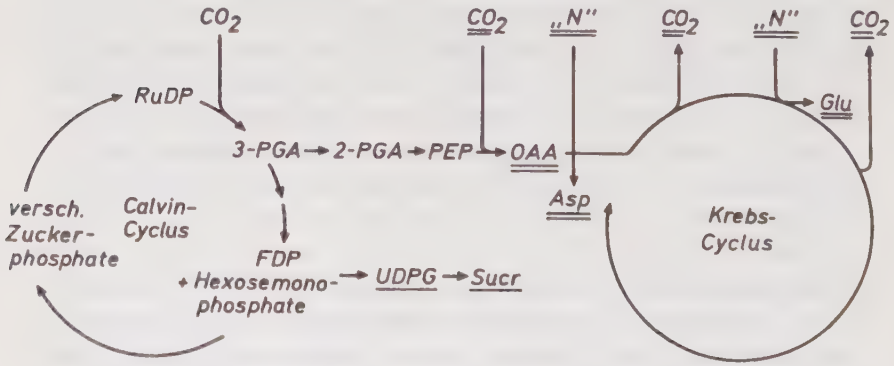
7) Dicarbonsäuren als mögliches Atmungssubstrat

Die bisher dargelegten Hypothesen über die Korrelation von Säurefixierung, Atmung und Stickstoffeinbau sagen notwendig noch nichts über die Natur des Atmungssubstrats aus. Die erwähnte Korrelation könnte durchaus gegeben sein, ohne daß eine der beteiligten Dicarbonsäuren das Substrat der Atmung liefern müßte. Die Atmungsaktivierung würde in diesem Falle z.B. nur zur Bereitstellung der für die Nitrat-Assimilation benötigten Reduktions-Äquivalente erfolgen. Als Atmungssubstrat könnte dann eine ganz andere Substanz - etwa das Glycolat - fungieren. Es gibt aber doch Argumente, die dafür sprechen, daß zumindest im Dunkeln und unter Schwachlichtbedingungen die Dicarbonsäuren das Substrat der Atmung wenigstens teilweise liefern.

Wie bereits erwähnt, zwingt der Verlauf der ^{14}C-Fixierungs- und der CO_2-Gaswechselkurven zu der Annahme, daß besonders im schwachen Blaulicht ganz beträchtliche Anteile photosynthetisch assimilierten Kohlenstoffs schnell wieder veratmet werden (S. 57/58). Diese Anteile müssen sich unter den früh markierten Verbindungen befinden, wenn man nicht annehmen will,

daß sie den Weg von ihrer Fixierung bis zu ihrer Wiederfreisetzung als $^{14}CO_2$-Molekül so schnell durchlaufen, daß sie zwischendurch überhaupt nicht als radioaktives Fixierungsprodukt faßbar sind. Wie aber besonders Versuch 6 (Abb. 11 - 20) zeigt, dominieren im schwachen Blaulicht Dicarbonsäuren derart unter den markierten Verbindungen, daß es schwer vorstellbar erscheint, das Atmungssubstrat sei ausschließlich unter anderen Verbindungen zu finden. Nimmt man jedoch die Dicarbonsäuren als Atmungssubstrat an, so bietet sich als wahrscheinlichster Mechanismus ihres respiratorischen Abbaues der KREBS-Cyclus an, wenn man durch keinerlei experimentelle Erfahrung gestützte Hypothesen vermeiden will. Hierzu paßt auch, daß Glutamat mit beträchtlicher Verzögerung nach Aspartat markiert wird. Dabei mag offen bleiben, ob Oxalacetat als solches in den Cyclus eintritt oder etwa erst nach zwei Decarboxylierungen - also nach sofortiger teilweiser "Veratmung" - als Acetyl-CoA.

Diese zumindest unter Schwachlichtbedingungen wahrscheinlichsten Stoffwechselwege werden durch folgendes Schema wiedergegeben (die Verbindungen des blaulichtgeförderten Weges sind doppelt, die der unter N-Mangelbedingungen begünstigten Reaktionsfolge einfach unterstrichen):



b) Mögliche Steuerunsmechanismen

Nach Erörterung der vom Licht beeinflußten Stoffwechselwege sollen im folgenden mögliche Ansatzpunkte für einen lichtgesteuerten Eingriff in diese Reaktionsfolgen nur kurz diskutiert werden.

Die Frage nach dem Receptor der Lichtquanten wurde u.a. von KOWALLIK (53) sowie von PICKETT und FRENCH (77) an Hand der für den Blaulichteffekt ermittelten Wirkungsspektren erörtert. Von KOWALLIK wird ein Carotinoid oder ein Flavin, von PICKETT und FRENCH ein Flavin als Receptor angenommen. Nach Arbeiten von SCHMID (86, 87) wird man jedoch im Flavinmononucleotid einen wahrscheinlichen Photoreceptor für die beschriebenen Lichteffekte sehen müssen. Auf diese Arbeiten wird noch einzugehen sein.

Zunächst sei jedoch versucht, die Glieder der Kausalkette "von hinten", d.h. beginnend bei den bereits analysierten lichtbedingten Änderungen des Stoffwechselflusses, in den Blick zu bekommen.
Jede derartige Regulation kann nur durch Einwirkung auf die Stoffwechselgleichgewichte erfolgen, d.h. wenigstens eine der drei Arten von Verbindungen, die diese Gleichgewichte bestimmen, muß beeinflußt werden:

1. die Substrate der Umsetzungen (Phosphatester, Aminosäuren, org. Säuren, anorg. Stickstoff),
2. die Cofaktoren (z.B. die "assimilatory power": ATP und NADPH),
3. die Enzyme.

Es seien deshalb die Möglichkeiten der Beeinflussung der Konzentrationen bzw. Aktivitäten dieser 3 Substanzgruppen kurz geprüft.

1. Einflüsse auf die Substratkonzentrationen

Da das Licht die Substratmengen nicht unmittelbar ändern kann,

bleiben nur zwei Möglichkeiten:

a. Durch Änderungen des Verlaufs vorhergehender oder nachfolgender Reaktionen können Gleichgewichte verschoben werden. So kann beispielsweise eine gestörte Proteinsynthese eine verstärkte Saccharoseproduktion zur Folge haben (S. 69). Damit ist jedoch letztlich keine Antwort auf die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Lichtsteuerung gegeben; es ist lediglich der Angriffspunkt hierfür an anderer Stelle zu suchen.

b. Unmittelbarer könnte das Licht dagegen durch die Beeinflussung der Permeabilität von Membranen Substratkonzentrationen regeln. So wurde z.B. von STROTMANN und RIED (99) die Möglichkeit erörtert, daß die Regelung der Stickstoffaufnahme durch blaulichtabhängige Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran erfolgen könnte.

Auf jeden Fall muß der Chloroplastenmembran, selbst wenn ihre Permeabilität keinerlei Lichteinflüssen unterworfen wäre, als Barriere zwischen verschiedenen Reaktionsräumen eine große Bedeutung für Regulationsvorgänge zugeschrieben werden, weil kaum zu erwarten ist, daß sich alle Steuerungsmechanismen in den Chloroplasten und im Cytoplasma in gleicher Weise auswirken können. Das heißt aber, daß die in den Chloroplasten wirksamen Steuerungsprozesse getrennt von denen des Cytoplasmas analysiert werden müßten. Damit stellt sich die Frage, wo - d.h. innerhalb welcher Reaktionsräume der Zelle - die einzelnen chemischen Umsetzungen ablaufen könnten. Anhaltspunkte für die Lokalisierung der verschiedenen Photosynthese-Intermediärprodukte liefern u.a. Arbeiten von HEBER et al. (30 - 33). Sie wurden bereits in einer früheren Arbeit diskutiert (83). Erwähnt sei nur noch, daß SCHÜRMANN (89) 1968 zeigen konnte, daß in isolierten Chloroplasten im Blaulicht die ^{14}C-Markierung von Phosphoglycerat, im Rotlicht die von Zuckerphosphaten relativ begünstigt ist. Insoweit muß die Steuerung durch das Licht also bereits innerhalb der Chloroplasten einsetzen.

2. Regulation über die Cofaktoren

Falls die "assimilatory power" in ihrer stofflichen Zusammensetzung je nach Lichtfarbe variiert, könnten jeweils verschiedene Dunkelreaktionen begünstigt werden.

Nach LUNDEGARDH (60) bewirkt blaugrünes Licht eine verstärkte Reduktion von $NADP^+$, während rotes Licht die Photophosphorylierung relativ stärker fördert. Es könnte nun erwartet werden, daß durch eine Vergrößerung des Verhältnisses ATP/NADPH Phosphorylierungen, durch eine Verkleinerung dagegen Reduktionen relativ begünstigt werden. Es wäre deshalb z.B. leicht vorstellbar, daß eine Verringerung dieses Verhältnisses, also eine Erhöhung des Anteils an reduziertem Pyridinnucleotid, den Kohlenstoffeinbau in Dicarbonsäuren gegenüber dem Einbau in Zuckerphosphate erhöhen könnte, da der Reaktionsverlauf von Phosphoglycerat zu den Dicarbonsäuren nur Pyridinnucleotid, die Reduktion von Phosphoglycerat zu Triosephosphaten dagegen außerdem ATP erfordert.

3. Einflüsse auf die Enzyme

Über den Einfluß des Lichtes auf Enzymaktivitäten liegen zahlreiche Untersuchungen vor (12, 26, 29, 45, 61, 62, 68, 69, 103, 127). Auch sie wurden bereits früher (83) erörtert. Soweit in diesen Fällen die Wirkungsweise des Lichtes geklärt werden konnte, erfolgt die Regulation über die Konzentrationen von Substraten und Cofaktoren. 1969 wurde jedoch erstmals über den Fall einer direkteren Lichtwirkung berichtet: SCHMID (86) sowie SCHMID und SCHWARZE (87) beobachteten eine Hemmung der FMN-abhängigen Glycolat-Oxidase aus einer Tabak-Aureamutante und einer chlorophyll- und carotinoidfreien Chlorella-Mutante durch blaues Licht. Außerdem stellten sie eine blaulichtbedingte Aktivitätssteigerung der ebenfalls FMN-abhängigen Glycin-Oxidase der gleichen Algenmutante fest. Dabei sind die gleichen Lichtqualitäten und -intensitäten wirksam, die auch die Steigerung von Atmung und Nitritreduktion bei Chlorella verursachen. Zwar wirkt das Licht auch hier über das Coenzym, die Beeinflussung erfolgt aber doch

viel unmittelbarer als in den vorher beschriebenen Fällen: Primär wird Flavinmononucleotid durch Photoaktivierung in den Triplet-Zustand überführt; diese Anregung bewirkt dann eine unmittelbar folgende Änderung des Enzymproteins und damit der Enzymaktivität.

Wie weit die Steuerung des Stoffwechselflusses nun tatsächlich auf diese oder eine ähnliche Weise erfolgt, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen. Die Vermutung, diese könnten noch langwierig sein, wird nahe gelegt durch die Tatsache, daß wohl noch in keinem Falle der Regulation pflanzenphysiologischer Phänomene durch das Licht die Kausalkette von der Reception der Lichtquanten bis zur erkennbaren Auswirkung lückenlos überschaubar ist.

V. Zusammenfassung

Zur Klärung der Farblichteffekte auf Stoffwechselwege des photosynthetischen Kohlenstoffeinbaues wurden die Beziehungen zwischen dem Gaswechsel und dem ^{14}C-Einbau unter der Wirkung monochromatischen Lichtes an Chlorella pyrenoidosa untersucht. Dazu wurden CO_2-Gaswechselmessungen während gleichzeitiger $^{14}CO_2$-Fixierungen durchgeführt. Der ^{14}C-Einbau in Einzelverbindungen wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Dünnschicht-Chromatographie, Dünnschicht-Elektrophorese und Autoradiographie ermittelt.

Mit sinkender Beleuchtungsintensität erfolgt eine zunehmende Verminderung bzw. Unterdrückung des Blau-Maximums der Kurve der CO_2-Aufnahme in Abhängigkeit von der Wellenlänge, während das Rot-Maximum unverändert bleibt. Dieser Effekt läßt sich mit der Verstärkung der Atmung durch schwaches Blaulicht erklären.

Der gleichartige Verlauf der Kurve der ^{14}C-Fixierung in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der entsprechenden CO_2-Gaswechselkurve läßt auf eine enge Verbindung zwischen Photosynthese und Atmung schließen.

Im Schwachlichtbereich fördern Bedingungen, welche die Atmung relativ zur Photosynthese begünstigen - wie Blaulicht und Verringerung der Beleuchtungsintensität - die relative ^{14}C-Markierung insbesondere von Aspartat, Glutamat und Malat. Bedingungen, welche die Photosynthese relativ zur Atmung begünstigen, erhöhen die relative und absolute Markierung von Phosphatestern und Saccharose.
Im Starklichtbereich werden diese Effekte von einer photosynthesebedingten Förderung des ^{14}C-Einbaues in die Dicarbonsäuren überlagert. Insbesondere die Aspartat-Markierung folgt dem Wirkungsspektrum der Photosynthese, ist aber im Blaulicht immer höher als im Rotlicht. Aspartat- und Malat-Markierung scheinen im Starklichtbereich kompetitiv zu erfolgen, wobei die Stickstoffversorgung die Aspartat-Markierung bestimmt.

Zwei chlorophyllfreie und damit zur Photosynthese unfähige Chlorella-Mutanten zeigen ein Markierungsmuster, das dem der Dunkelfixierung grüner Chlorellen ähnlich ist (überwiegender ^{14}C-Einbau in Aspartat, Glutamat und Malat) und das auch durch Farblicht keine signifikante Änderung erfährt.

Die Stärke der Aspartat-Markierung scheint Ausdruck der Stickstoffversorgung zu sein.
Kommt es durch Stickstoffmangel - z. B. infolge fehlenden Nitrats im Nährmedium oder infolge fehlenden Blaulichtes - zu einer Störung der Eiweißsynthese, so erfolgt als Alternative eine reichliche Saccharose-Produktion. Dementsprechend erhöht Puromycin, ein Hemmstoff der Proteinsynthese, unabhängig von der Lichtfarbe die Saccharose-Markierung.
Ein niedriger Quotient aus der Markierung von Aspartat und Saccharose scheint allgemein eine verringerte Proteinbildung anzuzeigen.

Rotlicht (bzw. fehlendes Blaulicht) verstärkt die Wirkungen von Stickstoffmangel auf die ^{14}C-Fixierungsmuster. Dabei kann im Extremfall über die Hälfte des fixierten Radiokohlenstoffs auf Kosten aller anderen Fixierungsprodukte in Saccharose gebunden sein. Bei reichlicher Stickstoffversorgung dagegen erscheint auch im Rotlicht Saccharose kaum als markierte Verbindung. Stattdessen ist dann im langwelligen Spektralbereich die Markierung von Phosphatestern begünstigt.

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß Atmung, Stickstoffeinbau und Synthese der Dicarbonsäuren eng miteinander korreliert sind und gleiche oder ähnliche Abhängigkeit von Beleuchtungsintensität und Lichtwellenlänge zeigen. Nitrat- und Nitritreduktion bedürfen offenbar der aus der Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat hervorgehenden Dicarbonsäuren als N-Akzeptoren. Deshalb muß ein z.B. durch Blaulicht verstärkter N-Einbau mit einer beschleunigten Synthese von Dicarbonsäuren und damit einer beschleunigten Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat gekoppelt sein.
Es wird ein Stoffwechselschema diskutiert, in dem die Dicarbonsäuren als Atmungssubstrat auftreten.

Verwendete Abkürzungen:

Ala	Alanin
Asp	Aspartat
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
Citr	Citrat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
FMN	Flavinmononucleotid
F6P	Fructose-6-phosphat
Fum	Fumarat
GAP	Glycerinaldehydphosphat
Gln	Glutamin
G1P	Glucose-1-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
Gler	Glycerat
Glol	Glycolat
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
Mal	Malat
$NAD(P)^+$	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat), ox.
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat), red.
OAA	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGA	Phosphoglycerat
PGlol	Phosphoglycolat
R5P	Ribose-5-phosphat
RuDP	Ribulose-1,5-diphosphat
SDP	Sedoheptulose-1,7-diphosphat
Ser	Serin
Succ	Succinat
Sucr	Saccharose
Thr	Threonin
UDPG	Uridindiphosphoglucose
ZMP	Zuckermonophosphate

VI. Literaturverzeichnis

1. AHMED, A.M.M.: Veränderungen der CO_2-Fixierung im Entwicklungscyclus von Chlorella pyrenoidosa. Dissertation, Tübingen 1967.

2. AHMED, A.M.M., and E. RIES: The pattern of $^{14}CO_2$ fixation in different phases of life cycle and under different wavelenghts in Chlorella pyrenoidosa. In: H. Metzner (ed.): Progress in Photosynthesis Research. Vol. III. Pp. 1662-1668, Tübingen 1969.

3. BANDURSKI, R.S.: Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoenolpyruvate and CO_2. J. Biol. Chem. 217, 137-150 (1955).

4. BANDURSKI, R.S., and C.M. GREINER: The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoryl-enolpyruvate and carbon dioxide. J. Biol. Chem. 204, 781-786 (1953).

5. BASSHAM, J.A.: Kinetic studies of the photosynthetic carbon reduction cycle. Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 101-120 (1964).

6. BASSHAM, J.A., and M. CALVIN: The path of carbon in photosynthesis. Englewood Cliffs N.J. 1957.

7. BASSHAM, J.A., and M. KIRK: Dynamics of the photosynthesis of carbon compounds. I. Carboxylation reactions. Biochim. Biophys. Acta 43, 447-464, (1960).

8. BASSHAM, J.A., and M. KIRK: Photosynthesis of amino acids. Biochim. Biophys. Acta 90, 553-563 (1964).

9. BECKER, J.D., G. DÖHLER und K. EGLE: Die Wirkung monochromatischen Lichtes auf die extrazelluläre Glycolsäure-Ausscheidung bei der Photosynthese von Chlorella. Z. f. Pflanzenphysiol. 58, 212-221 (1968).

10. BENDIX, S., and M.B. ALLEN: Ultra-violet induced mutants of Chlorella pyrenoidosa. Arch. Mikrobiol. 41, 115-141 (1962).

11. BENSON, A.A., J.A. BASSHAM, M. CALVIN, J.C. GOODALE, V.A. HAAS and W. STEPKA: The path of carbon in photosynthesis. V. Paperchromatography and radioautography of the products. J. Am. Chem. Soc. 72, 170-178 (1950).

12. BJÖRN, L.O.: The effect of blue and red light on NADP-linked glyceraldehydephosphate dehydrogenases in excised roots. Phys. Plant. 20, 519-527 (1967).

13. BORNEFELD, T.: Der Einfluß von Nitratmangel und Farblicht auf den Phosphat- und Kohlenhydrat-Intermediärstoffwechsel der einzelligen Grünalge Ankistrodesmus braunii.
Dissertation, Würzburg 1970.

14. BRADBEER, J.W., S.L. RANSON and M. STILLER: Malate synthesis in crassulacean leaves. Plant Physiol. 33, 66-70 (1958).

15. BRAVDO, B.-A.: Decrease in net photosynthesis caused by respiration.
Plant Physiol. 43, 479-483 (1968).

16. BULLEY, N.R., C.D. NELSON and E.B.TREGUNNA: Photosynthesis: Action spectra for leaves in normal and low oxygen.
Plant Physiol. 44, 678-684 (1969).

17. CALVIN, M.: Photosynthesis. U.S. Atomic Energy Comm. Publ. UCRL-8278 (o.O.), 1958.

18. CALVIN, M., and J.A. BASSHAM: The photosynthesis of carbon compounds. New York 1962.

19. CASPER, R., und A. PIRSON: Grund- und Säurestoffwechsel in Blättern von Kalanchoe rotundifolia HAW bei Farblichtkultur.
Flora 156, 177-196 (1965).

20. CAYLE, T., and R. EMERSON: Effect of wavelength on the distribution of carbon-14 in the early products of photosynthesis. Nature 179, 89-90 (1957).

21. CHAN, H.W.-S., and J.A. BASSHAM: Metabolism of ^{14}C-labeled glycolic acid by isolated spinach chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 141, 426-429 (1967).

22. CHANG, W.-H., and N.E. TOLBERT: Distribution of C^{14} in serine and glycine after $^{14}CO_2$-photosynthesis by isolated spinach chloroplasts.
Plant Physiol. 40, 1048-1052 (1965).

23. DAVIES, D.D., J. GIOVANELLI, and T. AP REES: Organic acid metabolism.
In: Plant Biochemistry. Pp. 156-177. Oxford 1964.

24. EL-HISSY, F.T.: Untersuchungen über Alters- und Lichtabhängigkeit des Kohlenstoffeinbaus in Pilzmyzelien.
Dissertation, Tübingen 1968.

25. ERISMANN, K.H.: Habilitationsschrift, Bern 1970.

26. FEIERABEND, J., und A. PIRSON: Die Wirkung des Lichts auf die Bildung von Photosynthese-Enzymen in Roggenkeimlingen.
Z. Pflanzenphysiol. 55, 235-245 (1966).

27. FOCK, H.: Die Lichtatmung der grünen Pflanzen. Eine kritische Darstellung der bisher erarbeiteten Ergebnisse. Habilitationsschrift, Frankfurt a.M. 1969.

28. FOCK, H., G. KROTKOV and D.T. CANVIN: Photorespiration in liverworts and leaves. In: H. METZNER (ed.): Progress in Photosynthesis Research. Vol. I. Pp. 482-487, Tübingen 1969.

29. HALL, D.O., C. HUFFAKER, M. SHANNON and A. WALLACE: Influence of light on dark carboxylation reactions in etiolated barley leaves. Biochim. Biophys. Acta 35, 540-542 (1959).

30. HATCH, M.D., and C.R. SLACK: Photosynthesis by sugarcane leaves. Biochem. J. 101, 103-111 (1966).

31. HATCH, M.D., and C.R. SLACK: A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem. J. 106, 141-146 (1968).

32. HATCH, M.D., C.R. SLACK and H.S. JOHNSON: Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar-cane and its occurence in other plant species. Biochem. J. 102, 417-422 (1967).

33. HATTORI, A.: Light-induced reduction of nitrate, nitrite, and hydroxylamine in a blue-green alga, Anabaena cylindria. Plant Cell Physiol. 3, 355-369 (1962).

34. HAUSCHILD, A.H.W., C.D. NELSON and G. KROTKOV: The effect of light quality on the products of photosynthesis in Chlorella vulgaris. Can. J. Botany 40, 179-189 (1962).

35. HAUSCHILD, A.H.W., C.D. NELSON and G. KROTKOV: The effect of light quality on the products of photosynthesis in green and blue-green algae and in photosynthetic bacteria. Can. J. Botany 40, 1619-1630 (1962).

36. HAUSCHILD, A.H.W., C.D. NELSON and G. KROTKOV: Concurrent changes in the products of photosynthesis in Chlorella vulgaris in the presence of blue light. Naturwissenschaften 51, 274 (1964).

37. HAUSCHILD, A.H.W., C.D. NELSON and G. KROTKOV: On the mode of action of blue light on the products of photosynthesis in Chlorella vulgaris. Naturwissenschaften 52, 435 (1965).

38. HEBER, U.: Untersuchungen zur Physiologie und Biochemie der Chloroplasten im Zusammenhang mit der Proteinsynthese. Habilitationsschrift, Bonn 1963.

39. HEBER, U., N.G. PON and M. HEBER: Localization of carboxydismutase and triosephosphate dehydrogenases in chloroplasts.
Plant Physiol. 38, 355-360 (1963).

40. HEBER, U., und J. WILLENBRINK: Die Kinetik des ^{14}C-Einbaues in Chloroplasten und Cytoplasma unter kurzdauernder Photosynthese.
Naturwissenschaften 50, 506 (1963).

41. HEBER, U., and J. WILLENBRINK: Sites of synthesis and transport of photosynthetic products within the leaf cell.
Biochim. Biophys. Acta 82, 313-324 (1964).

42. HESS, J.L., and N.E. TOLBERT: Changes in chlorophyll a/b ratio and products of $^{14}CO_2$ fixation by algae grown in blue or red light.
Plant Physiol. 42, 1123-1130 (1967).

43. HORVATH, I., and K. SZASZ: Effect of light intensity on the metabolic pathways in photosynthesis.
Nature 207, 546-547 (1965).

44. HORVATH, I., and K. SZASZ: Effect of spectral composition of light on the accumulation of carbohydrates and nitrogen compounds.
In: H. METZNER (ed.): Progress in Photosynthesis Research. Vol. III, Pp. 1675-1677. Tübingen 1969.

45. HUFFAKER, R.C., R.B. OBENDORF, C.J. KELLER and G.E. KLEINKOPF: In vivo light stimulation of carboxylative phase enzyme activities in greening barley seedlings.
Plant Physiol. 39 Suppl. XIV (1964).

46. JACKSON, W.A.: Comments on water and CO_2 transport in the photosynthetic process.
In: A. SAN PIETRO, F.A. GREER and T.J. ARMY (ed.): Harvesting the sun. Pp. 249-254. London 1967.

47. KEARNEY, P.C., and N.E. TOLBERT: Appearance of glycolate and related products of photosynthesis outside of chloroplasts.
Arch. Biochem. Biophys. 98, 164-171 (1962).

48. KESSLER, E.: Nitrate assimilation by plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 57-72 (1964).

49. KLUGE, M.: Der CO_2-Gaswechsel der Sukkulenten - eine ökologische Anpassung?
Umschau 69, 210-211 (1969).

50. KORTSCHAK, H.P., C.E. HARTT and G.O. BURR: Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves.
Plant Physiol. 40, 209-213 (1965).

51. KOWALLIK, W.: The effects of the blue and of the red regions of the spectrum on the composition and cell division of synchronized Chlorella.
Planta 58, 337-365 (1962).

52. KOWALLIK, W.: Die Proteinproduktion von Chlorella im Licht verschiedener Wellenlängen.
Planta 64, 191-200 (1965).

53. KOWALLIK, W.: Action spectrum for an enhancement of endogenous respiration by light in Chlorella.
Plant Physiol. 42, 672-676 (1967).

54. KOWALLIK, W.: Der Einfluß von Licht auf die Atmung von Chlorella bei gehemmter Photosynthese.
Planta 86, 50-62 (1969).

55. KOWALLIK, W.: Eine fördernde Wirkung von Blaulicht auf die Säureproduktion anaerob gehaltener Chlorellen.
Planta 87, 372-384 (1969).

56. KOWALLIK, W., and H. GAFFRON: Respiration induced by blue light.
Planta 69, 92-95 (1966).

57. KOWALLIK, U., und W. KOWALLIK: Eine wellenlängenabhängige Atmungssteigerung während der Photosynthese von Chlorella.
Planta 84, 141-157 (1969).

58. LOSADA, M., A.V. TREBST, D.I. ARNON: Photosynthesis by isolated chloroplasts. XI. CO_2 assimilation in a reconstituted chloroplast system.
J. Biol. Chem. 235, 832 (1960).

59. LUDWIG, J., G. KROTKOV and D.T. CANVIN: The relationship of the products of photosynthesis to the substrates for CO_2-evolution in light and darkness.
In: H. METZNER (ed.): Progress in Photosynthesis Research. Vol. I. Pp. 494-502. Tübingen 1969.

60. LUNDEGARDH, H.: Non-activity of cytochrome oxidase in the photosynthesis.
Physiol. Plantarum 17, 379-383 (1964).

61. MARCUS, A.: Photocontrol of formation of red kidney bean leaf TPN linked triosephosphate dehydrogenase.
Plant Physiol. 35, 126-128 (1960).

62. MARGULIES, M.M.: Relationship between red light mediated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase formation and light dependent development of photosynthesis.
Plant Physiol. 40, 57-61 (1965).

63. METZNER, H.: Papierchromatographische Trennung der Photosynthese-Intermediärprodukte.
Naturwissenschaften 49, 183 (1962).

64. METZNER, H.: Photosynthese, Nat. Rundschau 18, 49-56 (1965).

65. METZNER, H.: Zur Messung der $^{14}CO_2$-Aufnahme in pflanzlichen Zellen.
Revue roumaine de Biologie 13, 69-72 (1968).

66. METZNER, H., und H. LORENZEN: Untersuchungen über den Photosynthese-Gaswechsel an vollsynchronisierten Chlorella-Kulturen.
Ber. Dtsch. bot. Ges. 73, 410-417 (1960).

67. METZNER, H., H. RAU und H. SENGER: Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit einzelner Pigmentmangel-Mutanten von Chlorella.
Planta, 65, 186-194 (1965).

68. MÜLLER, B., und H. ZIEGLER: Die lichtinduzierte Aktivitätssteigerung der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. IX. Die Reaktion in isolierten Chloroplasten.
Planta 85, 96-104 (1969).

69. MÜLLER, B., I. ZIEGLER, H. ZIEGLER: Die lichtinduzierte Aktivitätssteigerung der $NADP^+$-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in Chloroplasten. Zum Mechanismus der Reaktion.
Europ. J. Biochem. 9, 101-106 (1969).

70. NIEL, C.B. van, M.B. ALLEN and B.E. WRIGHT: On the photochemical reduction of nitrate by algae.
Biochim. Biophys. Acta 12, 67-74 (1953).

71. OGASAWARA, N., and S. MIYACHI: Effect of wavelength on $^{14}CO_2$-fixation in Chlorella cells.
In: H. METZNER (ed.): Progress in Photosynthesis Research. Vol. III, Pp. 1653-1661. Tübingen (1969).

72. OHLENROTH, K., und H. MOHR: Die Steuerung der Proteinsynthese und der Morphogenese bei Farnvorkeimen durch Licht.
Planta 59, 429-441 (1963).

73. ONGUN, A., and C.R. STOCKING: Effect of light on the incorporation of serine into the carbohydrates of chloroplasts and nonchloroplast fractions of tobacco leaves.
Plant Physiol. 40, 819-824 (1965).

74. ONGUN, A., and C.R. STOCKING: Effect of light and dark on the intracellular fate of photosynthetic products.
Plant Physiol. 40, 825-831 (1965).

75. OSMOND, C.B.: ß-Carboxylation during photosynthesis in Atriplex.
Biochim. Biophys. Acta 141, 197-199 (1967).

76. PAYER, H.D.: Die Untersuchungen zur Kompartimentierung der freien Aminosäure Alanin in Farnvorkeimen im Rotlicht und im Blaulicht.
Planta 86, 103-115 (1969).

77. PICKETT, J.M., and C.S. FRENCH: The action spectrum for blue-light-stimulated oxygèn uptake in Chlorella.
Proc. nat. Acad. Sci. US. 57, 1587-1593 (1967).

78. PIRSON, A., und W. KOWALLIK: Wirkung des blauen und roten Spektralbereiches auf die Zusammensetzung von Chlorella bei Anzucht im L-D-Wechsel.
Naturwissenschaften 47, 476-477 (1960).

79. POSKUTA, G.: Photosynthesis and respiration. I. Effect of light quality on the photorespiration in attached shoots of spruce.
Experientia 24, 796-797 (1968).

80. RABSON, R., N.E. TOLBERT and P.C. KEARNEY: Formation of serine and glyceric acid by the glycolate pathway.
Arch. Biochem. Biophys. 98, 154-163 (1962).

81. RANSON, S.L., and M. THOMAS: Crassulacean acid metabolism.
Ann. Rev. Plant Physiol. 11, 81-110 (1960).

82. RIED, A.: Über die Wirkung blauen Lichtes auf den photosynthetischen O_2-Austausch von Chlorella.
Planta 87, 333-346 (1969).

83. RIES, E.: Einfluß von Rot- und Blaulicht auf den Kohlenstoffeinbau in frühe Intermediärprodukte der Photosynthese.
Diplomarbeit. Tübingen (1967).

84. RIES, E.: Farblichteffekte auf den Gaswechsel und den ^{14}C-Einbau bei Chlorella pyrenoidosa.
Photosynthetica 4, 78-80 (1970).

85. SCHAEL, U., und H. CLAUS: Die Wirkung von Rotlicht und Blaulicht auf die Photosynthese von Acetabularia mediterranea.
Planta 78, 98-114 (1968).

86. SCHMID, G.H.: The effect of blue light on glycolate oxidase of tobacco.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1035-1046 (1969).

87. SCHMID, G.H., and P. SCHWARZE: Blue light enhanced respiration in a colorless Chlorella mutant.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1513-1520 (1969).

88. SCHOSER, G.: Eine Anlage zur Erzeugung monochromatischer Strahlung für photobiologische Untersuchungen.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 79, 271-278 (1966).

89. SCHÜRMANN, P.: Die Beeinflussung der CO_2-Fixierung isolierter Chloroplasten durch Rot- und Blaulicht.
Verh. d. Schweiz. Naturf. Ges. 1968, S. 121-122.

90. SCHÜRMANN, P.: Separation of phosphate esters and algal extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography.
J. Chromatog. 39, 507-509 (1969).

91. SENGER, H.: Untersuchungen zur Synchronisierung von Chlorella-Kulturen. Arch. Mikrobiol. 40, 47-72 (1961).

92. SENGER, H., und H.J. WOLF: Eine automatische Verdünnungsanlage und ihre Anwendung zur Erzielung homokontinuierlicher Chlorella-Kulturen.
Arch. Mikrobiol. 48, 81-94 (1964).

93. SLACK, C.R., and M.D. HATCH: Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses.
Biochem. J. 103, 660-665 (1967).

94. SMITH, D.C., J.A. BASSHAM and M. KIRK: Dynamics of the photosynthesis of carbon compounds. II. Amino acid synthesis. Biochim. Biophys. Acta 48, 299-313 (1961).

95. SNYDER, F.: Anal. Biochem. 9, 183 (1964).

96. SPLITTSTOESSER, W.E.: Dark CO_2 fixation and its role in the growth of plant tissue. Plant Physiol. 41, 755-759 (1966).

97. STROTMANN, H.: Blaulichteffekt auf die Nitritreduktion von Chlorella.
Planta 73, 376-380 (1967).

98. STROTMANN, H.: Untersuchungen zur lichtabhängigen Nitritreduktion von Chlorella.
Planta 77, 32-48 (1967).

99. STROTMANN, H., und A. RIED: Polarographische Messung der Nitritreduktion von Chlorella im monochromatischen Licht.
Planta 85, 250-269 (1969).

100. TCHEN, T.T., and B. VENNESLAND: CO_2 fixation into oxalacetate.
Federation Proc. 13, 310 (1954).

101. TCHEN, T.T., and B. VENNESLAND: Enzymatic CO_2 fixation into oxalacetate in wheat germ.
J. Biol. Chem. 213, 533-546 (1955).

102. TOLBERT, N.E.: Glycolate Pathway.
In: Photosynthetic mechanisms of green plants.
Publ. 1145 Nat. Acad. of Sciences Nat. Res. Council.
Pp. 648-662. Washington 1963.

103. TOLBERT, N.E., and F.B. GAILEY: Carbon dioxide fixation by etiolated plants after exposure to white light. Plant Physiol. 30, 491-499 (1955).

104. TREBST, A.V., Y. TSUJIMOTO and I. ARNON: Separation of light and dark phases in the photosynthesis of isolated chloroplasts. Nature 182, 352-355 (1958).

105. TREGUNNA, E.B., J. DOWNTON and P. JOLLIFFE: Genetic and environmental control of photorespiration. In: H. METZNER (ed.): Progress in Photosynthesis Research. Vol. I. Pp. 488-493. Tübingen 1969.

106. TRUKHIN, N.V.: Effect of the carbon supply on the response of Chlorella pyrenoidosa to the effects of blue and red light. Fiziol. Rast. 15, 652-657 (1968).

107. URBACH, W., M.A. HUDSON, W. ULLRICH, K.A. SANTARIUS und W. HEBER: Verteilung und Wanderung von Phosphoglycerat zwischen den Chloroplasten und dem Cytoplasma während der Photosynthese. Z. Naturforsch. 20 b, 890-898 (1965).

108. UTTER, M.F., and K. KURAHASHI: Mechanism of action of oxalacetic carboxylase. J. Biol. Chem. 207, 821-840 (1954).

109. VOSKRESENSKAYA, N.P.: Influence of the spectral distribution of light on the products of photosynthesis. Dokl. Akad. Nauk SSSR 86, 429-439 (1952).

110. VOSKRESENSKAYA, N.P.: The effect of illumination on the nature of photosynthesis products. Trudy Inst. Fiziol. Rastenii im K.A. Timiryazeva, Akad. Nauk S.S.S.R. 8, 42-56 (1953).

111. VOSKRESENSKAYA, N.P.: Formation of organic acids and amino acids in photosynthesis in various conditions of illumination. Fiziol. Rastenii Akad. Nauk S.S.S.R. 3, 49-57 (1956). Zitiert nach Chem. Abstr. 50:7962 d.

112. VOSKRESENSKAYA, N.P., and G.S. GRISHINA: Utilization of $^{14}CO_2$ by plants under different illumination conditions. Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R. 106, 565-568 (1956). Zitiert nach Chem. Abstr. 50:10197.

113. VOSKRESENSKAYA, N.P., and G.S. GRISHINA: Prolonged effect of the spectral composition of light on plants. Fiziol. Rastenii, Akad. Nauk S.S.S.R. 5, 147-155 (1958). Zitiert nach Chem. Abstr. 52:13018 f.

114. VOSKRESENSKAYA, N.P., and E.P. NECHAYEVA: Effect of blue, red and green light on the protein, nucleid acid and chlorophyll content in young barley plants. Fiziol. Rast. 14, 299-307 (1967).

115. VOSKRESENSKAYA, N.P., A.Y. WILL, G.S. GRISHINA, T.R. PARNIK: Effect of oxygen concentration and light intensity on the distribution of labelled carbon in photosynthesis products in bean plants. Photosynthetica 4, 1-8 (1970).

116. WALKER, D.A.: Carboxylierungsvorgänge in Pflanzen. Endeavour XXV, 21 (1966).

117. WANG, D., and R.H. BURRIS: Carbon metabolism of ^{14}C-labeled amino acids in wheat leaves. II. Serine and its role in glycine metabolism. Plant Physiol. 38, 430-439 (1963).

118. WANG, D., and E.R. WAYGOOD: Carbon metabolism of ^{14}C-labeled amino acids in wheat leaves. I.A. pathway of glyoxylate-serin metabolism. Plant Physiol. 37, 826-832 (1962).

119. WEGMANN, K.: Der Weg des Kohlenstoffs bei der Photosynthese und Dunkelfixierung in Dunaliella spec. Dissertation, Tübingen 1968.

120. WEISSBACH and HORECKER: The formation of glycine from ribose-5-phosphate. In: A symposium on amino acid metabolism. W.E. Mc Elroy & H.R. Glass, eds. Baltimore. Pp. 741-742.

121. WILKINSON, A.P., and D.D. DAVIES: Serine-glycine interconversion in plant tissues. Nature 181, 1070-1071 (1958).

122. WILSON, A.T., and M. CALVIN: The photosynthetic cycle. CO_2 dependent transients. J. Am. Chem. Soc. 77, 5948-5957 (1955).

123. YEMM, E.W.: Photorespiration and photosynthesis in young leaves of barley. In: H. METZNER (ed.): Progress in Photosynthesis Research. Vol. I. Pp. 474-481, Tübingen 1969.

124. ZAK, E.G.: Influence of molecular oxygen on the formation of amino acids during photosynthesis in Chlorella under various conditions of illumination. Fiziol. Rast. 12, 263-269 (1965).

125. ZELITCH, I.: Organic acids and respiration in photosynthetic tissues. Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 121-142 (1964).

126. ZELITCH, I.: Water and CO_2 transport in the photosynthetic process. In: A. SAN PIETRO, F.A. GREER and T.J. ARMY (ed.): Harvesting the sun. Pp. 231-248. London 1967.

127. ZIEGLER, H., I. ZIEGLER und H.J. SCHMIDT-CLAUSEN: Der Einfluß der Intensität und Qualität des Lichtes auf die Aktivitätssteigerung der $NADP^+$-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Planta 67, 344-356 (1965).

Lebenslauf

Am 2. August 1925 wurde ich, Eberhard Ries, als Sohn des Verlegers und Redakteurs Dr. Hermann Ries und seiner Ehefrau Josefine, geb. Tenwiggenhorn, in Westerstede (Oldb) geboren.

Von 1932 bis 1936 besuchte ich die Volksschule, anschließend bis 1941 die damalige Höhere Bürgerschule meines Heimatortes und schließlich die Hindenburgschule (Oberschule für Jungen) in Oldenburg. Bei meiner Einberufung zum Militärdienst im Mai 1943 wurde ich von der Hindenburgschule mit dem damaligen Reifevermerk entlassen.

Nach Entlassung aus der Kriegsgefangenschaft (März 1947) nahm ich zur Erlangung der Hochschulreife am Staatlichen Gymnasium in Oldenburg an einem halbjährigen Übergangslehrgang teil und bestand am 9. September 1947 die Reifeprüfung. Danach studierte ich ab Sommer 1948 an der Universität Göttingen zwei Semester Naturwissenschaften, wechselte aber im dritten Semester zur Volkswirtschaft über.

Im Sommer 1952 trat ich als Prokurist in den väterlichen Betrieb, einen kleinen Zeitungsverlag mit Druckerei, ein.

Im Wintersemester 1957/58 nahm ich an der Universität Göttingen mein naturwissenschaftliches Studium mit dem Ziel der Mittelschullehrerprüfung wieder auf und setzte es vom Sommersemester 1959 bis zum Wintersemester 1959/60 an der Pädagogischen Hochschule in Göttingen im Institut zur Ausbildung von Mittelschullehrern fort. Im April 1959 bestand ich Teil A, im Februar 1960 Teil B und am 3.9.1962 den abschließenden Teil der Prüfung für das Lehramt an Mittelschulen in den Fächern Physik, Chemie und Biologie.

Vom 1. April 1960 bis 31. März 1966 stand ich im niedersächsischen Schuldienst an der Mittelschule Augustfehn, seit dem 1. November 1964 als Beamter auf Lebenszeit.

Am 1. April 1966 trat ich als technischer Angestellter in das Institut für Chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen ein. Hier bestand ich am 13. Dezember 1967 die Diplomprüfung in Biologie (Hauptfach Pflanzenphysiologie).

Seit dem 1. Januar 1968 verwalte ich die Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Chemische Pflanzenphysiologie in Tübingen.

Meine akademischen Lehrer in Göttingen waren insbesondere die Herren Professoren Brockmann, Glemser, Harder, Heberer, Henke, Pirson und Pohl, in Tübingen die Herren Professoren Bayer, Metzner und Weitzel.

An der vorliegenden Dissertation arbeitete ich von Anfang 1968 bis zum Sommersemester 1970 im Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Tübingen, unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Metzner. Ein Teil der Versuche wurde jedoch im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Bern durchgeführt.

Seit dem 26. Februar 1954 bin ich mit Lenchen, geb. Schröder, aus Apen (Oldb) verheiratet. Wir haben 4 Kinder.